



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.

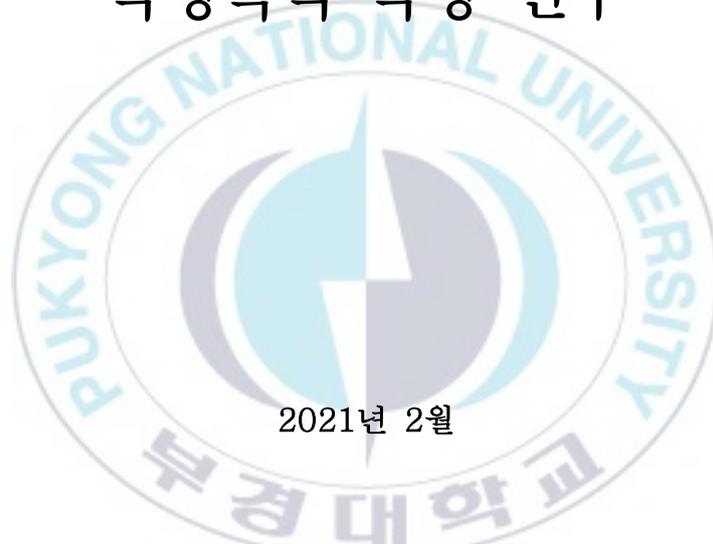
저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

Sulfadiazine의 경구투여에 따른
흰다리새우에서의 약물동태학 및
독성학적 특성 연구



2021년 2월

부 경 대 학 교 대 학 원

수 산 생 명 의 학 과

이 승 현

이 학 석 사 학 위 논 문

Sulfadiazine의 경구투여에 따른
흰다리새우에서의 약물동태학 및
독성학적 특성 연구

지도 교수 정준기

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함.

2021년 2월

부경대학교 대학원

수산생명의학과

이승현

이승현의 이학석사 학위논문을 인준함.

2021년 2월 19일



위원장 이학박사 강주찬 (인)

위원 약학박사 정준기 (인)

위원 농학박사 허민도 (인)

목차

List of Figure	iv
List of Table	vi
Abstract	viii
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	3
1. 시약 및 시험동물.....	3
2. 약제 투여 및 시료 채취.....	4
3. Sulfadiazine 추출을 위한 시료 전처리.....	5
3.1. 근육의 전처리.....	5
3.2. 혈림프의 전처리	6
3.3. 간췌장의 전처리	7
4. LC-MS/MS 분석 조건	8
5. 표준곡선 작성 및 회수율	12

5.1. 근육에서의 회수율 측정	13
5.2. 혈림프에서의 회수율 측정.....	14
5.3. 간척장에서의 회수율 측정.....	15
6. 정확도, 정밀도, 검출한계 및 정량 한계.....	16
7. 혈액 · 생화학적 지표	17
7.1. 혈구 계수	17
7.2. T-Cholesterol.....	17
7.3. Glucose.....	18
7.4. Total protein.....	18
7.5. GOT.....	19
7.6. GPT	19
8. 병리조직학적 독성	20
9. 약물동태학적 분석.....	21
III. 결과	22
1. 표준곡선 및 회수율.....	22

2. 정확도, 정밀도, 검출한계 및 정량한계	24
3. 투여 농도, 온도에 따른 sulfadiazine의 잔류량 변화	25
3.1. 근육에서의 잔류량 변화	25
3.2. 혈림프에서의 잔류량 변화	28
3.3. 간체장에서의 잔류량 변화	31
4. 약물동태학적 해석	34
4.1. 근육 내 약물동태학적 해석	34
4.2. 혈림프 내 약물동태학적 해석	38
4.3. 간체장 내 약물동태학적 해석	42
5. 혈액·생화학적 지표 해석	46
6. 병리조직학적 독성 해석	48
IV. 고찰	52
V. 요약	56
VI. 참고문헌	58
VII. 감사의 글	64

List of Figure

Fig. 1.	Calibration curve for the assay of sulfadiazine	23
Fig. 2.	Muscle concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	26
Fig. 3.	Muscle concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C	27
Fig. 4.	Hemolymph concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	29
Fig. 5.	Hemolymph concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C	30
Fig. 6.	Hepatopancreas concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	32
Fig. 7.	Hepatopancreas concentration (mg/kg) of sulfadiazine in <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C	33
Fig. 8.	Hematological parameters of <i>L. vannamei</i> hemolymph	47
Fig. 9.	Micrographs of <i>L. vannamei</i> muscle were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration.	49
Fig. 10.	Micrographs of <i>L. vannamei</i> hepatopancreas were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration.	50

Fig. 11. Micrographs of *L. vannamei* antennal gland were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration. 51



List of Table

Table 1.	LC instruments and analysis conditions for sulfadiazine.	9
Table 2.	MS/MS instruments and analysis conditions for sulfadiazine	10
Table 3.	Mass spectrometry parameters for quantification and confirmation for sulfadiazine	11
Table 4.	Recovery of sulfadiazine from muscle, hemolymph, hepatopancreas samples of <i>Litopenaeus vannamei</i>	23
Table 5.	Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the muscle of <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	36
Table 6.	Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the muscle of <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C	37
Table 7.	Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hemolymph of <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	40
Table 8.	Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hemolymph of <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C	41
Table 9.	Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hepatopancreas of <i>L. vannamei</i> after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C	44

Table 10. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hepatopancreas of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7 days at 20°C 45



Pharmacokinetics and Toxicological characteristic after oral administration of sulfadiazine to whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*

Seung Hyun Lee

Department of aquatic life medicine, Pukyong National University

Busan 48513, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the pharmacokinetic and toxicological properties of sulfadiazine when administered orally to whiteleg shrimp. Feeds containing 80, 240 and 400 mg/kg of sulfadiazine were administered orally at 20°C and 28°C for 7 days. After oral administration of sulfadiazine, the amount of drug residue in the tissue (muscle, hemolymph, and hepatopancreas) was analyzed over time using LC-MS/MS. Pharmacokinetic characteristics were derived from the drug residual data using Pk Solver program. Residual amount decreased with time in muscle, hemolymph, and hepatopancreas, and the residual amount increased significantly as the concentration of sulfadiazine increased. In the muscle, hemolymph, and hepatopancreas administered sulfadiazine, the time to reach days of maximum concentration (T_{max}) was 0 days at all concentrations, and the maximum concentration (C_{max}) was in the order of hemolymph, muscle, and hepatopancreas. In all dose concentration groups, a large amount of sulfadiazine was excreted between 0 and 1 days

after the end of the administration, and the residual concentration became less than 0.1 mg/kg on the 3rd day after the end of the administration. The release rate of sulfadiazine was more rapidly at 28 °C than at 20 °C. Biochemical analysis of hemolymph and histopathologic analysis through H&E staining were performed to confirm the toxicity of sulfadiazine to whiteleg shrimp. As a result of biochemical index analysis, the number of hemocytes did not show any significant difference at all concentrations compared to the control group. Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and total protein were significantly decreased in all concentration groups compared to the control group. Glutamic pyruvic transaminase (GPT), total cholesterol and glucose showed a tendency to decrease in the 80mg/kg concentration group compared to the control group, and rather increase in the high concentration group. As a result of evaluating histopathologic toxicity to muscle, hepatic pancreas, and antennal glands, there was no change in all drug-administered groups compared to the control group. In conclusion, the results of this study on the pharmacokinetic and toxicity evaluation of sulfadiazine can be used as basic data necessary to establish the maximum residue level (MRL) and withdrawal period of sulfadiazine applicable to crustaceans in the future.

I. 서론

Sulfadiazine은 sulfonamide계 항생제이며 많은 수산물의 질병 구제에 사용된다(Romero, 2012). Sulfonamide계 항생제는 그람 양성 세균과 그람 음성 세균에 효과가 있는 광범위 항균제이다(Henry, 1943; Connor, 1998). Sulfonamide계 약물은 세균의 생존에 필수적인 엽산 합성의 전구체인 Para-aminobenzoic acid(PABA)와 구조적 유사성을 가지고 있다. 그러한 특성을 이용하여 PABA의 적용부위에 대신 적용되어 엽산 합성 방해를 통해 항균작용을 나타낸다(Sköld, O., 2001; Achari et al., 1997). 수산용 의약품으로 sulfadiazine은 주로 trimethoprim과의 혼합 제제로 사용되며 송어, 넙치, 방어, 뱀장어 등 어류의 세균성 질병 구제 목적으로 사용된다(국립수산과학원, 2018). 갑각류에 대해서 국내의 경우는 사용하고 있지 않지만, 태국, 베트남, 필리핀 등 외국에서는 sulfadiazine을 어류뿐만 아니라 새우류의 질병 구제 목적으로 사용하고 있다(Seafood watch, 2020; Cruz et al., 2000; Thuy et al., 2011). 전 세계적으로 흰다리새우는 급성 간췌장 괴사증(Acute hepatopancreatic necrosis disease, AHPND), 조기치사증후군(Early mortality syndrome, EMS), 흰반점바이러스(White spot syndrome virus, WSSV) 등 질병에 의한 폐사가 빈번하게 일어나고 그에 따라 항생제의 사용도 증가하는 실정이다(Thitamadee et al., 2016;

Moriarty, 1999; Holmström et al., 2003). 새우류의 경우, 2019년을 기준으로 약 68,564톤으로 수산물 품목 중 3번째로 많이 수입되고 있다. 그 중 베트남에서의 새우류 수입량이 28,799톤으로 가장 많이 이루어지고 있다(농림축산식품부, 2019). 현재 새우류를 수입할 때 설과제의 경우는 어류에 설정된 잔류허용기준인 0.1 mg/kg을 일률로 적용하여 검역한다. 하지만 추후 수산물에 허용 물질 목록 관리제(Positive list system, PLS)가 시행된다면 흰다리새우에는 sulfadiazine에 대한 잔류허용기준(Maximum residue limit, MRL)이 마련되어 있지 않기 때문에 일괄기준을 정하여 관리하게 된다. 일괄기준은 모든 물질에 적용할 수 있는 수준이어야 하기 때문에 엄격한 기준인 0.01 mg/kg 수준이다(식품의약품안전처, 2019). 따라서, PLS가 시행되면 sulfadiazine이 함유된 흰다리새우를 수입 시 일괄기준(0.01 mg/kg)을 초과하는 수산물이 발생할 수 있는 문제가 생기게 된다. 그러므로, PLS의 시행에 앞서 흰다리새우에 대한 sulfadiazine의 잔류허용기준을 설정하는 것이 우선적으로 필요하다. 하지만 잔류허용기준을 설정하는 데에 필요한 sulfadiazine의 약물동태학적 자료가 갑각류의 경우 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 흰다리새우에 대한 sulfadiazine의 온도, 투여 농도 별 잔류 농도 및 약물동태학적 분석을 실시하였으며 덧붙여 sulfadiazine이 흰다리새우에 미치는 약물 안전성을 평가하기 위하여 혈액생화학적 및 조직병리학적 독성 시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 시험동물

실험에 사용된 sulfadiazine은 99% 표준품으로 Sigma (USA) 제품을 사용하였다. 고성 소재의 양식장에서 체중 25 g 정도의 흰다리새우를 입수하여 실험동물로 사용하였다. 흰다리새우는 항생제 투여를 받은 적이 없는 건강한 개체로서 1톤 순환여과식 수조에서 실험 기간동안 사육하였다. 실험기간 동안의 사육 수온은 적정 수온인 28 °C, 비교 수온인 20 °C으로 일정하게 유지되었으며 염도는 30 ‰, pH는 7.0-8.0, DO는 5.0±0.3을 유지하였다.

2. 약제 투여 및 시료 채취

Sulfadiazine을 어체중 1 kg 당 80, 240, 400 mg의 농도가 되도록 무게를 단 뒤, 증류수에 녹여 사료 표면에 고루 흡착시켜주었다. 약물이 흡착된 사료를 일정기간 건조시킨 뒤 Fish oil로 코팅해준 후 급이 시까지 -20°C 에 보관하였다. Sulfadiazine이 흡착된 사료를 흰다리새우의 평균 체중인 25 g을 기준으로 하여 적정 일일 먹이공급량인 체중의 1.4 %를 1일에 3번으로 나누어 7일 동안 경구투여 하였다. 항생제가 흡착된 사료를 급이한 지 7일이 지난 시점을 0일로 두어 0, 1, 3, 7, 14, 28일마다 각 실험군에서 15마리씩 시료를 채취하였다. 흰다리새우를 얼음 마취 후 혈림프, 근육, 간췌장 시료 채취를 진행하였다. 혈림프는 항응고제인 Alsever's solution (Sigma, USA) 400 μl 가 담겨 진 1 ml 주사기를 이용하여 4:1의 비율로 채취하였다. 근육은 껍질이 혼입되지 않도록 꼬리와 머리 부분을 먼저 제거 후 채취하였다. 간췌장 또한 다른 조직과 섞이지 않도록 하여 채취하였다. 채취된 시료는 실험 진행 시까지 -80°C 에서 냉동 보관하였다.

3. Sulfadiazine 추출을 위한 시료 전처리

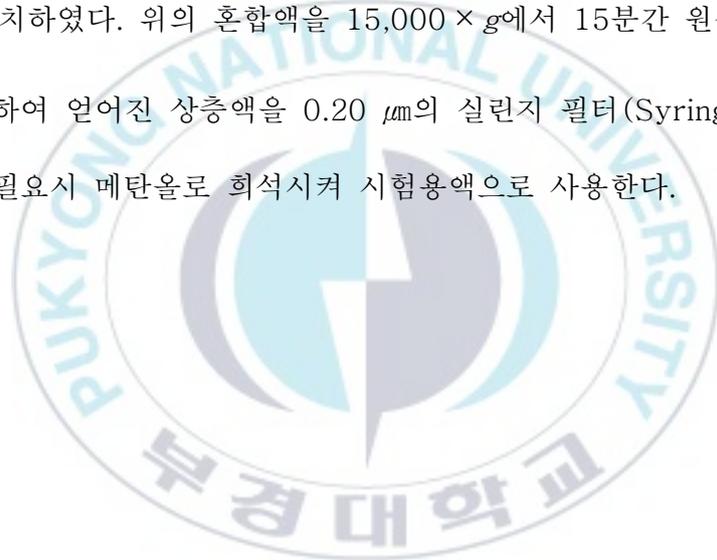
흰다리새우의 근육, 혈림프, 간체장에서 sulfadiazine을 추출하기 위해 식품 공전 및 어류 체내 잔류물질 검사법을 참고하여 전처리를 진행하였다.

3.1. 근육의 전처리

근육의 전처리는 식품 공전 (식품의약품안전처, 2019)에 공시되어 있는 설파제의 전처리 방법을 약간 변형하여 진행하였다. 흰다리새우 근육 0.5 g을 미량 저울에 달아 TissueLyser(Qiagen)를 이용하여 균질화 한 후 15 mL 원심분리관으로 옮긴다. 균질화 한 근육에 ACN (J.T.Baker, USA) 3 mL를 첨가하고 10분간 초음파 처리한다. 이를 4,500 × g 에서 10분간 원심분리한 후 새로운 15 mL Conical Tube에 상층액만 분리 해 둔다. 위의 과정을 2회 반복하여 상층액을 합한다. 얻어진 상층액을 질소를 이용하여 농축시킨다. 농축 후 남은 잔류물에 메탄올(Merck, USA) 1 mL를 가한 뒤 약 5분간 초음파 처리하여 용해시킨 뒤, 0.20 μm의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 필요시 메탄올로 희석시켜 시험용액으로 사용한다.

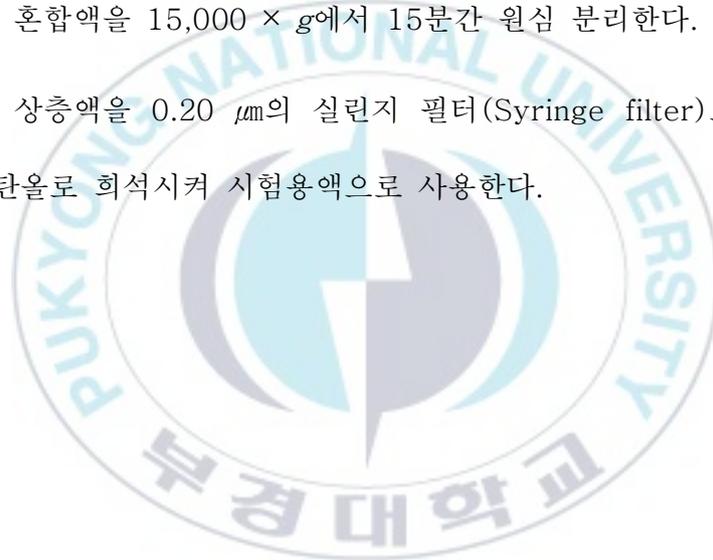
3.2. 혈림프의 전처리

혈림프의 전처리는 어류 체내 잔류물질 검사법 (국립수산과학원, 2000)에 명시되어 있는 설파제의 전처리 방법을 따라 진행하였다. 흰다리새우 혈림프 시료 200 μl 에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 200 μl 을 첨가하여 약 1분간 균질화 한 후 메탄올 200 μl 를 넣고 vortex로 혼합하여 상온에 10분간 방치하였다. 위의 혼합액을 15,000 $\times g$ 에서 15분간 원심 분리한다. 원심 분리하여 얻어진 상층액을 0.20 μm 의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 필요시 메탄올로 희석시켜 시험용액으로 사용한다.



3.3. 간체장의 전처리

간체장의 전처리는 어류 체내 잔류물질 검사법 (국립수산과학원)에 명시되어 있는 설파제의 전처리 방법을 따라 진행하였다. 간체장 시료 0.2 g에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 200 μ l를 첨가하여 약 1분간 균질화한 후 메탄올 200 μ l를 넣고 vortex로 혼합하여 상온에 10분간 방치하였다. 위의 혼합액을 15,000 \times g에서 15분간 원심 분리한다. 원심 분리하여 얻어진 상층액을 0.20 μ m의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 필요시 메탄올로 희석시켜 시험용액으로 사용한다.



4. LC-MS/MS 분석 조건

LC-MS/MS 분석 조건은 식품 공전에 공시되어 있는 식품 내 잔류 동물용 의약품 시험법 중 설파제의 정량시험법을 참고하였다. LC는 Acquity UPLC I-Class (Waters, US)을 사용하였으며 MS는 XEVO TQ-S micro (Waters, US)을 사용하여 LC-MS/MS를 진행하였다. LC 분석 조건은 Table 1.에 명시하였으며 MS/MS 분석조건은 Table 2.에 명시하였다. Sulfadiazine의 분석에 적합한 정량이온을 선정하여 MRM (multiple reaction monitoring) 모드로 분석하였는데 그 조건은 Table 3. 에 나타내었다.

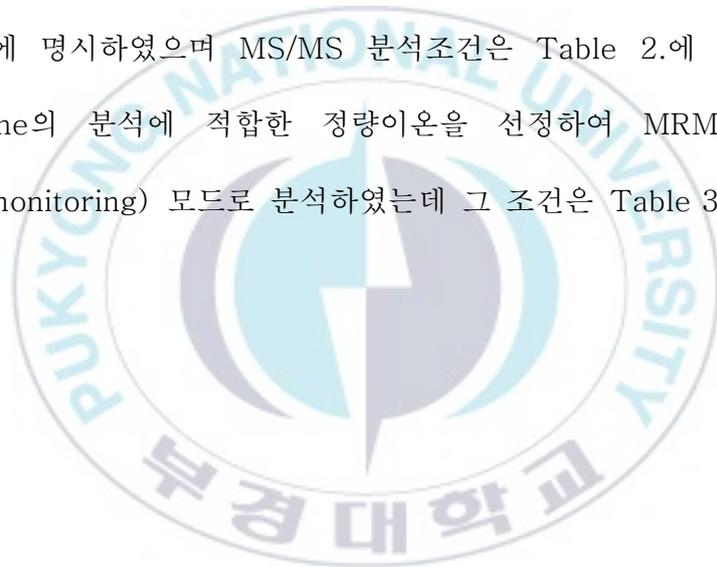


Table 1. LC instruments and analysis conditions for sulfadiazine

Instrument	Acquity UPLC I-Class (Waters, US)		
Column	Phenomenex KINETEX C18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm)		
Mobile phase	(A) : 0.1% Formic acid/Water (B) : 0.1% Formic acid/Acetonitrile Gradient system		
	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	90	10
	0.5	90	10
	3	65	35
	5	5	95
	5.5	5	95
	6	90	10
9	90	10	
Flow rate	0.5mL/min		
Column temperature	40°C		
Injection volume	2 μl		
Run time	10min		

Table 2. MS/MS instruments and analysis conditions for sulfadiazine

Instrument	XEVO TQ-S micro (Waters, US)
Ionization	ESI (positive)
Desolvation gas temperature	350 °C
Desolvation, Collision gas	N ₂ (800 l /Hr), Ar



Table 3. Mass spectrometry parameters for quantification and confirmation for sulfadiazine.

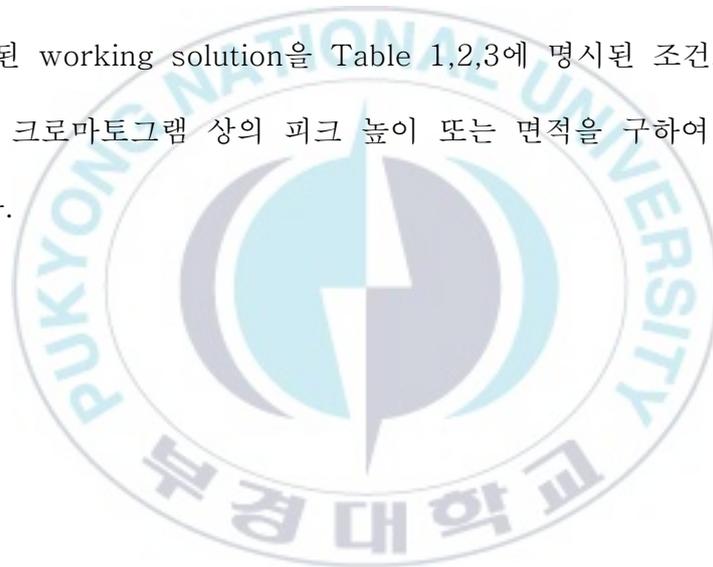
Compound	MW (g/mol)	Retention time (min)	Precursor ion (m/z)	Product ion (m/z)	Collision energy (eV)
Sulfadiazine	250.3	1.2	251	92*	27
				108	22
				156	15

*Quantification ion



5. 표준곡선 작성 및 회수율 측정

표준곡선 작성 및 회수율 측정 실험을 위하여 미량 저울로 sulfadiazine 1 mg을 달아 10 ml의 메탄올 용액으로 용해시켜 -20°C 에 냉동 보관하여 표준 용액(100 mg/l)으로 사용하였다. 표준 용액을 메탄올로 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/l 농도로 희석하여 표준곡선 작성에 사용하였다. 각 농도 별로 희석된 working solution을 Table 1,2,3에 명시된 조건으로 분석한 뒤 얻어진 크로마토그램 상의 피크 높이 또는 면적을 구하여 표준곡선을 작성하였다.

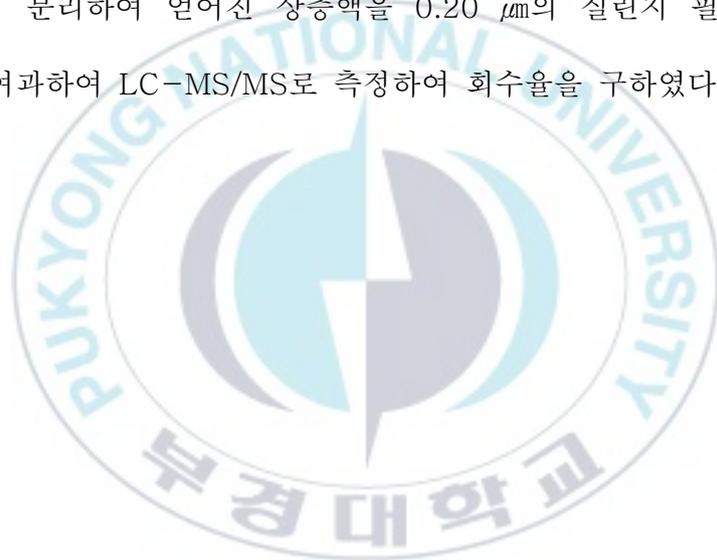


5.1. 근육에서의 회수율 측정

흰다리새우의 근육 0.5 g을 미량 저울에 달아 TissueLyser를 이용하여 균질화 한 후 15 ml 원심분리관으로 옮긴다. 균질화한 근육에 ACN 3 ml를 첨가하고 최종 농도가 0.2 mg/l이 되도록 stock solution을 넣은 뒤 약 5분간 균질화하여 10분간 초음파 처리한다. 이를 $4,500 \times g$ 에서 10분간 원심분리한 후 새로운 15 mL Conical Tube에 상층액만 분리 해 둔다. 위의 과정을 2회 반복하여 상층액을 합한다. 얻어진 상층액을 질소를 이용하여 농축시킨다. 농축 후 남은 잔류물에 메탄올 1 mL를 가한 뒤 약 5분간 초음파 처리하여 용해시킨 뒤, 0.20 μm 의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 LC-MS/MS로 측정하여 회수율을 구하였다.

5.2. 혈림프에서의 회수율 측정

흰다리새우의 혈림프 시료 200 μl 에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 200 μl 를 넣고 균질화하여 얻은 혈림프 균질액 50 μl 와 stock solution 50 μl 를 최종 농도가 0.05 ppm이 되도록 혼합하여 100 μl 의 메탄올을 넣고 실온에 10분간 방치하였다. 이를 15,000 $\times g$ 에서 15분간 원심 분리한다. 원심 분리하여 얻어진 상층액을 0.20 μm 의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 LC-MS/MS로 측정하여 회수율을 구하였다.



5.3. 간체장에서 회수율 측정

항생제를 투여 받지 않은 흰다리새우의 간체장 시료 0.2 g에 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) 200 μ l를 넣고 균질화하여 얻은 간체장 균질액 50 μ l 와 stock solution 50 μ l를 최종 농도가 0.05 ppm이 되도록 혼합하여 100 μ l의 메탄올을 넣고 실온에 10분간 방치하였다. 이를 15,000 \times g 에서 15분간 원심 분리한다. 원심 분리하여 얻어진 상층액을 0.20 μ m의 실린지 필터(Syringe filter)로 여과하여 LC-MS/MS로 측정하여 회수율을 구하였다.



6. 정확도, 정밀도, 검출 한계 및 정량 한계

검출한계, 정량한계를 구하기 위해 sulfadiazine의 표준 용액을 0.5 MRL, MRL, 2 MRL 이 포함된 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/ℓ 5단계로 희석하여 3반복 측정하였다. 측정된 농도에 대한 얻어진 크로마토그램상의 피크 높이 또는 면적을 구하여 표준곡선을 작성하였다. 각 표준곡선의 기울기의 평균과 Y절편의 표준편차의 평균을 이용하여 검출한계 및 정량한계를 산정하였다. 검출한계 = $3.3 \times \sigma / S$, 정량한계 = $10 \times \sigma / S$ 식에 대입하여 검출한계와 정량한계를 구하였다. 여기서 σ 는 검량선에서 Y절편의 표준편차를, S는 검량선의 기울기를 말한다. 정확도 및 정밀도를 확인하기 위해 sulfadiazine의 표준 용액을 0.5 MRL, MRL, 2 MRL이 포함된 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/ℓ 5단계로 희석하여 5일동안 1일당 3회씩 측정하였다.

7. 혈액 · 생화학적 지표

7.1. 혈구 계수

채취한 혈림프를 희석하여 혈구 계산 판(Hemocytometer)로 계수하였다. 이후 혈림프 희석 농도 및 혈구 계산 판 계수 법에 의해 값을 계산하였다.

7.2. T-Cholesterol

측정에 사용한 시약은 아산셋트 총 콜레스테롤 측정용 시액(아산제약주식회사, 한국)을 이용하여 측정하였으며 효소시액 1병을 완충액 1병으로 충분히 용해시켰다. 15 ml conical tube에 효소시액 3 ml과 혈림프 0.02 ml를 함께 잘 혼합하여 주었다. 이후 37 °C에서 5분간 반응시킨 후 96-well plate에 200 μ l씩 분주하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7.3. Glucose

측정에 사용한 시약은 아산셋트 글루코스 측정용 시액(아산제약주식회사, 한국)을 이용하여 측정하였으며 효소시액 1병을 완충액 1병으로 충분히 용해시켰다. 15 ml 튜브에 효소시액 3 ml과 헐림프 0.02 ml를 함께 잘 혼합하여 주었다. 이후 37 °C에서 5분간 반응시킨 후 96-well plate에 200 μ l씩 분주하여 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7.4. Total protein

측정에 사용한 시약은 아산셋트 총 단백 측정용시액(아산제약주식회사, 한국)을 이용하여 측정하였다. 15 ml 튜브에 정색시액 5 ml 취하였다. 이후 헐림프 0.05 ml를 넣고 섞어준 후 37 °C에서 30분 동안 방치시킨다. 이후 96-well plate에 200 μ l씩 분주하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7.5. GOT

측정에 사용한 시약은 아산셋트 지오티·지피티 측정용 시액(아산제약주식회사, 한국)을 이용하여 측정하였다. 15 ml 튜브에 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 측정용 기질액 1 ml을 37 °C에서 5분간 방치해둔다. 이후 튜브에 새우 혈림프 0.2 ml을 넣고 잘 섞은 후 37°C 1시간 방치시킨다. 이후 튜브에 정색시액 1 ml를 넣고 혼합하여 실온에 20분간 방치한다. 4N 수산화나트륨용액을 증류수로 10배 희석하여 만든 0.4N 수산화나트륨용액을 10 ml 넣고 혼합하여 실온에 10 분간 방치시킨다. 이후 96-well plate에 200 μ l씩 분주하여 505 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

7.6. GPT

측정에 사용한 시약은 아산셋트 지오티·지피티 측정용 시액(아산제약주식회사, 한국)을 이용하여 측정하였다. 15 ml 튜브에 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 측정용 기질액 1 ml을 37 °C에서 5분간 방치해둔다. 이후 튜브에 새우 혈림프 0.2 ml을 넣고 잘 섞은 후 37 °C 30분 방치시킨다. 이후 튜브에 정색시액 1 ml를 넣고 혼합하여 실온에 20분간 방치한다. 4N 수산화나트륨용액을 증류수로 10배 희석하여 만든 0.4N 수산화나트륨용액을 10 ml 넣고 혼합하여 실온에 10 분간 방치시킨다. 이후 96-well plate에 200 μ l씩 분주하여 505 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

8. 병리조직학적 독성

병리조직학적 독성을 평가하기 위하여 7일 동안의 sulfadiazine이 흡착된 사료의 경구투여 후 1일이 지난 개체를 얼음 냉각 마취하여 Davidson's solution에서 고정을 진행하였다. 새우 머리에서부터 첫번째 마디까지를 절단하여 머리부분과 근육부분을 나누었다. 주사기를 이용하여 머리와 근육에 고정액을 침투시킨 뒤 고정액에 보관하였다. 대조군은 일반 사료를 투여한 후 시험군과 같은 조건으로 고정하였다. 고정 후 간체장과 근육을 일부 절단하여 카세트에 삽입하는 재고정을 실시하였다. 그 후 파라핀을 이용한 포매를 하여 4 μm 의 두께로 박절 과정을 진행하였다. 박절 된 표본을 Hematoxylin-eosin 염색 후 봉입한 뒤 광학현미경으로 검경하였다.

9. 약물동태학적 분석

Sulfadiazine을 경구투여한 흰다리새우의 근육, 혈림프, 간체장 내 약물 농도 측정 결과를 바탕으로 two-compartmental model에 따라 PK Solver를 이용하여 C_{max} , T_{max} , AUC (area under the time-concentration curve) 등의 sulfadiazine의 약물동태학적 변수 (pharmacokinetic parameter) 를 구하였다.



Ⅲ. 결과

1. 표준곡선 및 회수율

sulfadiazine의 표준용액을 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/l 농도가 되도록 희석하여 LC/MS-MS로 측정하였다. 측정된 농도에 대한 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다. 상관계수는 0.999로 직선성을 검증하였고, CODEX guideline에서 제시하는 기준인 0.99 이상의 조건을 충족하였다(Fig. 1.).

회수율은 근육에서 0.1 mg/kg, 간채장과 혈림프에서 0.05 mg/kg 농도가 되도록 하여 stock solution을 첨가하고 전처리하여 얻은 결과를 Table 4.에 나타내었다.

Fig. 1. Calibration curve for the assay of sulfadiazine

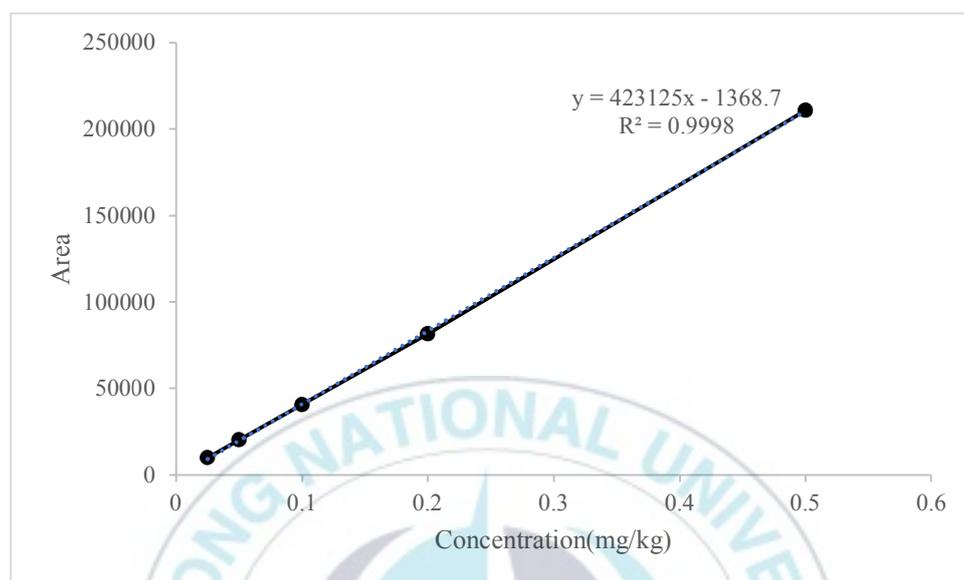


Table 4. Recovery of sulfadiazine from muscle, hemolymph, hepatopancreas samples of *Litopenaeus vannamei*

Sample	Fortified Concentration (mg/kg)	Recovery (%) Mean \pm SD	CV (%)
Muscle	0.1	83	1.5
Hemolymph	0.05	100	0
Hepatopancreas	0.05	107	1.4

2. 정확도, 정밀도, 검출한계 및 정량한계

정확도 및 정밀도를 확인하기 위해 sulfadiazine의 표준 용액을 0.5 MRL, MRL, 2 MRL이 포함된 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 mg/ℓ 5단계로 희석하여 5일동안 1일당 3회씩 측정하였다. 측정한 결과 intra-day, inter-day의 정확도가 모두 100 %였으며 CV값이 0으로, 정확도 및 정밀도가 검증되었다. 검출한계와 정량한계를 결정하기 위하여 각 표준곡선의 기울기의 평균과 Y절편의 표준편차의 평균을 이용하였다. 결과적으로 검출한계는 0.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 잔류분석을 위한 정량한계는 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 로 측정되었다. CODEX guideline에서 제시하는 기준으로 정량한계는 0.5MRL값 이하를 만족해야 하는데, 본 분석법의 정량한계는 2.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 으로 0.5MRL 값인 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 이하를 만족하였다.

3. 투여 농도, 온도에 따른 sulfadiazine의 잔류량 변화

3.1. 근육에서의 잔류량 변화

비교 수온인 20 °C와 적정 수온인 28 °C에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 근육 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Fig. 2,3에 나타내었다. 20 °C의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 3.08, 8.35, 10.02 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 28 °C의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 4.23, 8.28, 24.12 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 모든 수온 및 온도에서 시간이 흐름에 따라 잔류 농도가 낮아지는 양상을 보였다. Sulfadiazine의 투여 농도가 높을수록 잔류 농도가 높은 결과를 보아, 근육에서 sulfadiazine의 잔류가 농도의존적이라는 것을 알 수 있었다.

Fig. 2. Muscle concentration (mg/kg) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 20°C (Mean±SD, n = 15)

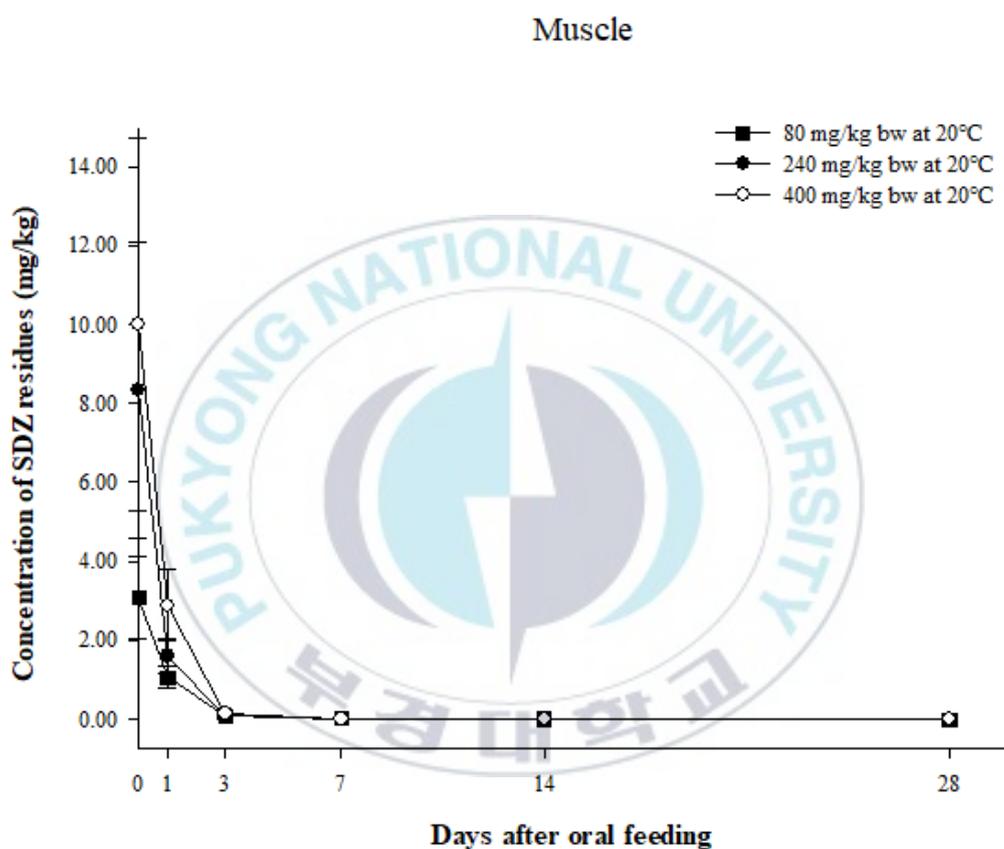
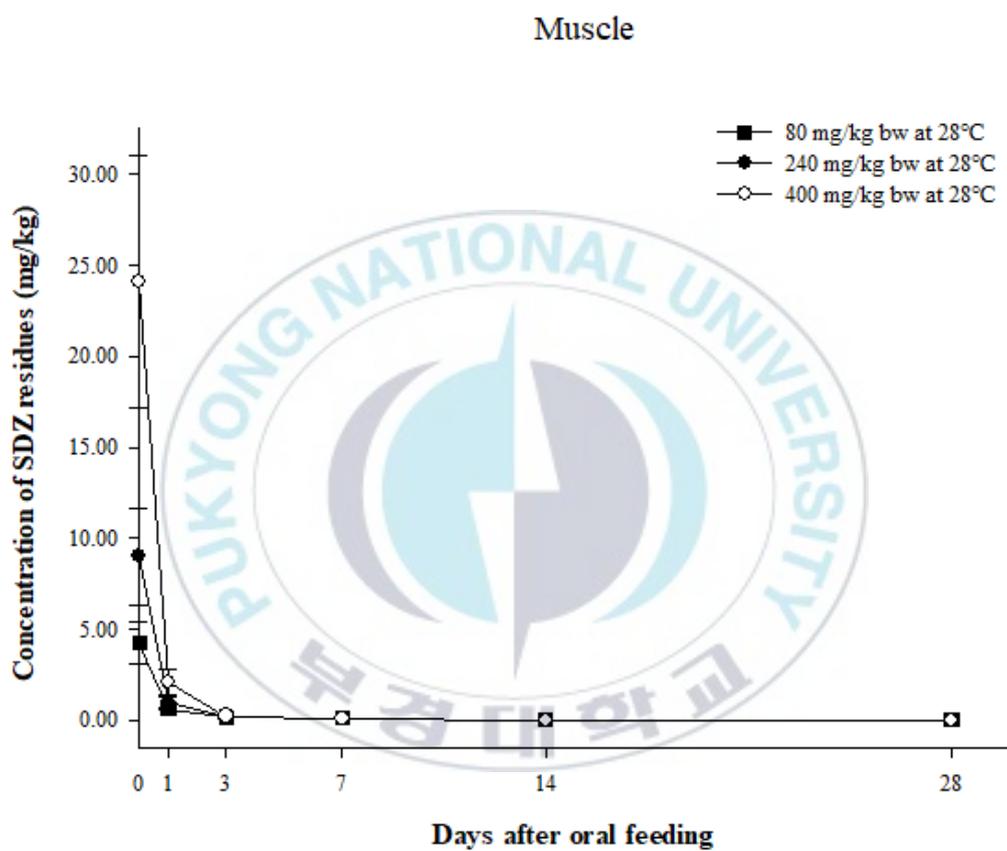


Fig. 3. Muscle concentration (mg/kg) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 28°C (Mean±SD, n = 15)



3.2. 혈림프에서의 잔류량 변화

비교 수온인 20 °C와 적정 수온인 28 °C에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 혈림프 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Fig. 4,5에 나타내었다. 20 °C의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 11.87, 19.74, 40.09 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 28 °C의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 9.17, 23.64, 47.55 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 모든 수온 및 온도에서 시간이 흐름에 따라 잔류 농도가 낮아지는 양상을 보였다. Sulfadiazine의 투여 농도가 높을수록 잔류 농도가 높은 결과를 보아, 혈림프에서 sulfadiazine의 잔류가 농도의존적이라는 것을 알 수 있었다.

Fig. 4. Hemolymph concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 20°C (Mean \pm SD, n = 10)

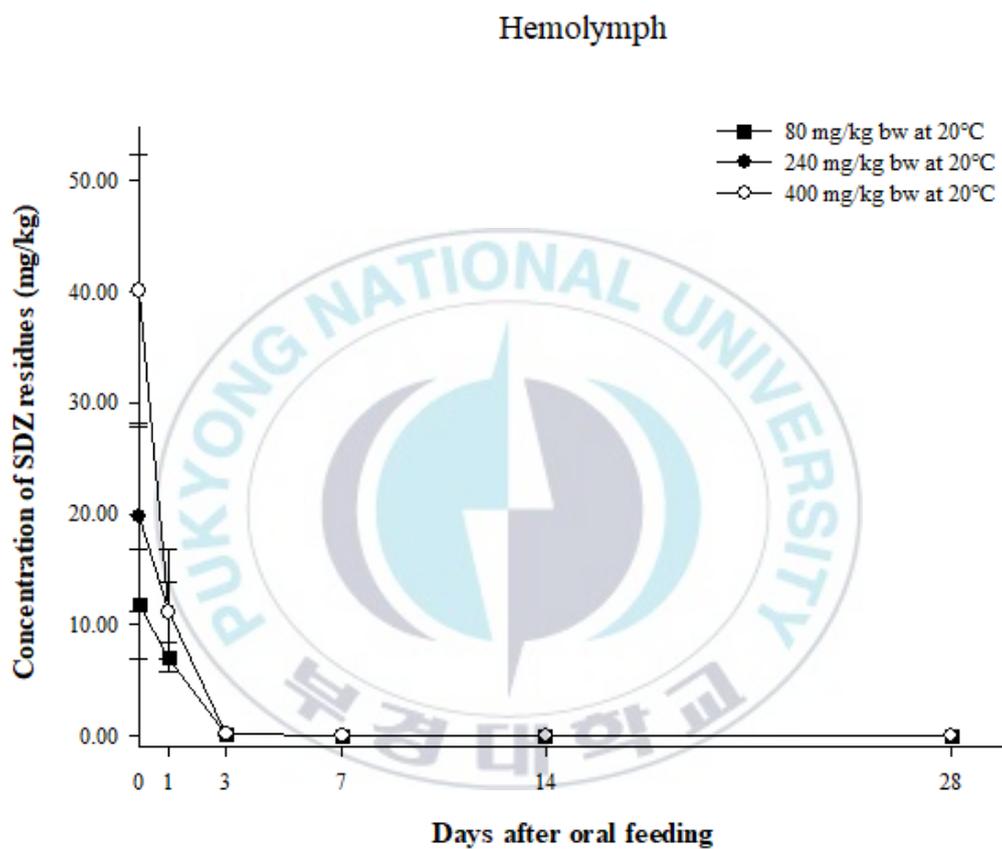
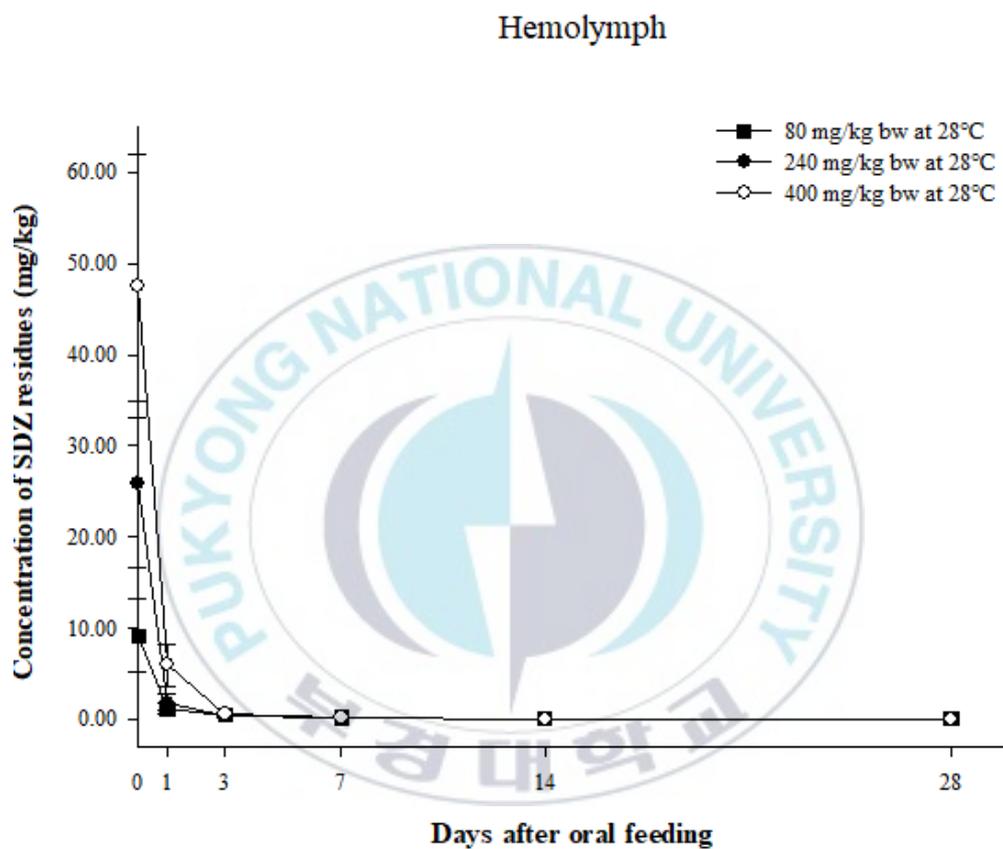


Fig. 5. Hemolymph concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 28°C (Mean \pm SD, n = 10)



3.3. 간체장에서 잔류량 변화

비교 수온인 20 ℃와 적정 수온인 28 ℃에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 간체장 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Fig. 6,7에 나타내었다. 20 ℃의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 2.65, 7.17, 14.83 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 28 ℃의 경우, 모든 농도에서 투여 종료 0일차에 잔류 농도가 가장 높았으며, 각각 2.04, 3.20, 14.36 mg/kg으로 나타났다. 모든 농도에서 투여 종료 3일차에 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 측정되었다. 모든 수온 및 온도에서 시간이 흐름에 따라 잔류 농도가 낮아지는 양상을 보였다. Sulfadiazine의 투여 농도가 높을수록 잔류 농도가 높은 결과를 보아, 간체장에서 sulfadiazine의 잔류가 농도의존적이라는 것을 알 수 있었다.

Fig. 6. Hepatopancreas concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 20°C (Mean \pm SD, n = 10)

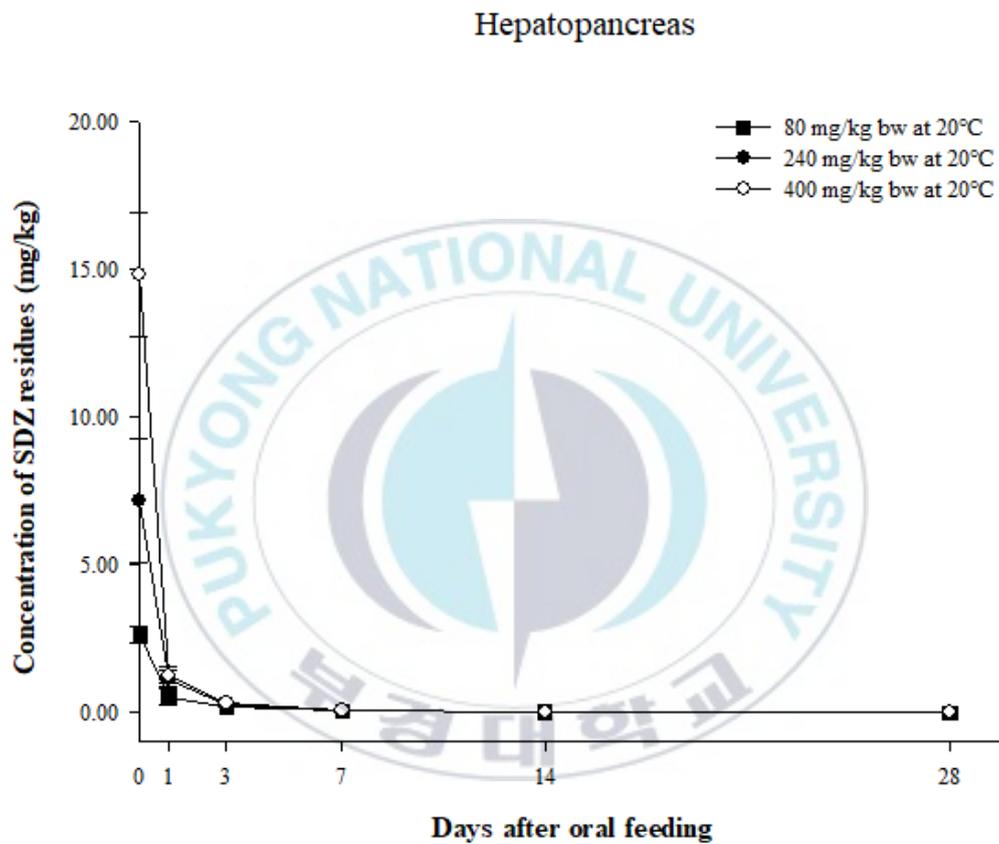
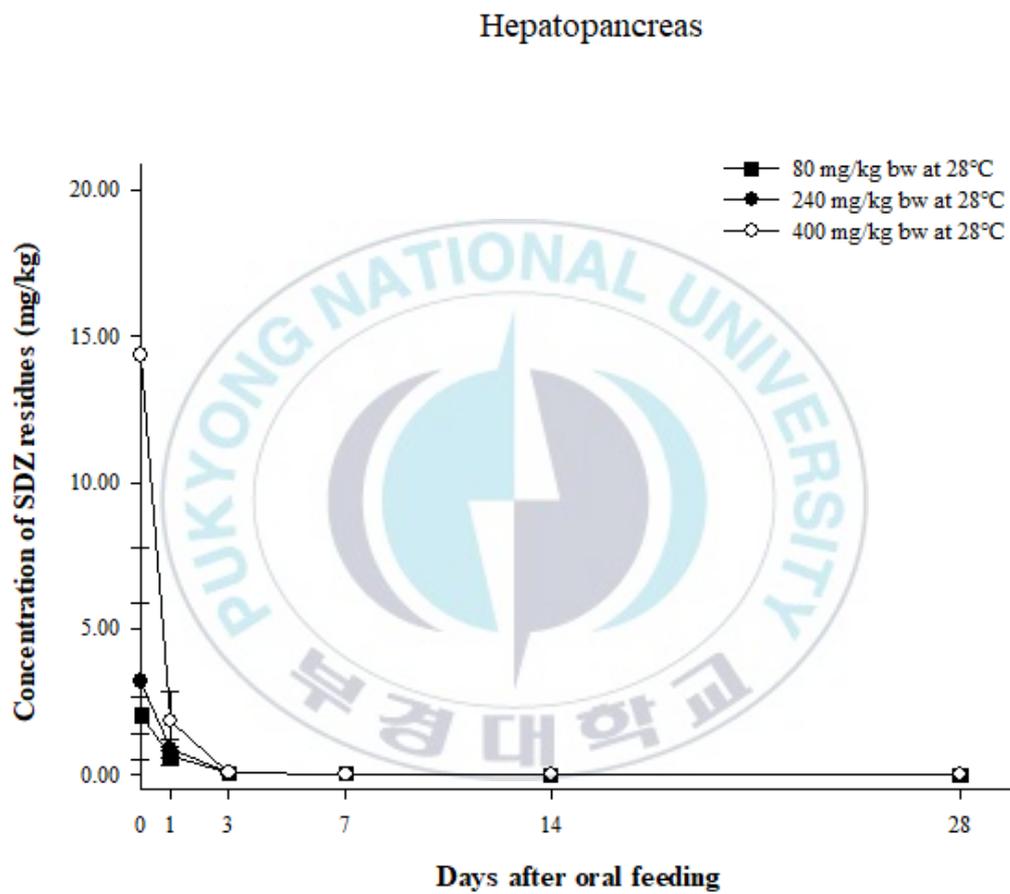


Fig. 7. Hepatopancreas concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of sulfadiazine in *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400ppm for 7days at 28°C (Mean \pm SD, n = 10)



4. 약물동태학적 해석

4.1. 근육 내 약물동태학적 해석

비교 수온인 20 °C와 적정 수온인 28 °C에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 근육 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Table 4,5에 나타내었다. 비교수온인 20 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 근육 내 최고농도 도달시간 (T_{max})은 모든 농도에서 0일로 나타났으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 3.08, 8.35, 10.02 mg/kg으로 나타났다. 근육 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 3.69, 7.69, 10.07 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 20.83, 21.85, 17.45일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 3.85, 2.33, 1.62일로 나타났다.

적정 수온인 28 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구 투여 후 근육 내 최고농도 도달시간 (T_{max}) 은 모든 농도에서 0일로 나타났으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 4.23, 8.28, 24.12 mg/kg으로 나타났다. 근육 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 4.22, 6.76, 16.60 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 5.87, 5.76, 6.66일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 2.66, 1.78, 0.92일로 나타났다.



Table 5. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the muscle of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7 days at 20°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	20.83	21.85	17.45
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	3.08	8.35	10.02
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	3.69	7.69	10.07
$MRT_{0-\infty}$ (d)	3.85	2.33	1.62

Table 6. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the muscle of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7 days at 28°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	5.87	5.76	6.66
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	4.23	8.28	24.12
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	4.22	6.76	16.60
$MRT_{0-\infty}$ (d)	2.66	1.78	0.92

4.1. 혈림프 내 약물동태학적 해석

비교 수온인 20 °C와 적정 수온인 28 °C에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 혈림프 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Table 6,7에 나타내었다. 비교수온인 20 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 혈림프 내 최고농도 도달시간 (T_{max})은 모든 농도에서 0일로 나타났으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 11.87, 19.74, 40.09 mg/kg으로 나타났다. 혈림프 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 17.08, 7.69, 10.07 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 18.85, 21.50, 21.15일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 1.35, 1.14, 0.82일로 나타났다.

적정 수온인 28 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 혈림프 내 최고농도 도달시간 (T_{max}) 은 모든 농도에서 0일로 나타났으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 9.17, 23.64, 47.55 mg/kg으로 나타났다. 혈림프 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 8.51, 16.99, 35.54 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 5.04, 4.80, 5.46일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 2.01, 1.12, 0.78일로 나타났다.



Table 7. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hemolymph of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	18.85	21.50	21.15
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	11.87	19.74	40.09
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	17.08	27.77	37.60
$MRT_{0-\infty}$ (d)	1.35	1.14	0.82

Table 8. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hemolymph of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	5.04	4.80	5.46
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	9.17	23.64	47.55
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	8.51	16.99	35.54
$MRT_{0-\infty}$ (d)	2.01	1.12	0.78

4.2. 간체장 내 약물동태학적 해석

비교 수온인 20 °C와 적정 수온인 28 °C에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 시간 경과에 따른 간체장 내 약물동태학적 요인을 분석한 결과를 수온별로 각각 Table 6,7에 나타내었다. 비교수온인 20 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 간체장 내 최고농도 도달시간 (T_{max})은 모든 농도에서 0일로 나타났으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 2.65, 7.17, 14.83 mg/kg으로 나타났다. 간체장 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 3.03, 6.44, 10.73 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 5.99, 5.90, 5.69일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 2.78, 1.80, 1.20일로 나타났다.

적정 수온인 28 °C에서 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구 투여 후 간체장 내 최고농도 도달시간 (T_{max}) 은 모든 농도에서 0일로 나타났다으며, 최고농도 (C_{max})는 각각 2.04, 3.20, 14.36 mg/kg으로 나타났다. 간체장 내 농도-시간곡선하 면적 ($AUC_{0-\infty}$)은 각각 2.48, 3.57, 10.7 mg/kg·d로 나타났다. 그 외 배설반감기 ($T_{1/2}$)는 각각 9.73, 10.70, 10.32 일로 나타났고 평균체류시간 ($MRT_{0-\infty}$)은 각각 3.31, 3.18, 1.233일로 나타났다.



Table 9. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hepatopancreas of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 20°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	5.99	5.90	5.69
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	2.65	7.17	14.83
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	3.03	6.44	10.73
$MRT_{0-\infty}$ (d)	2.78	1.80	1.20

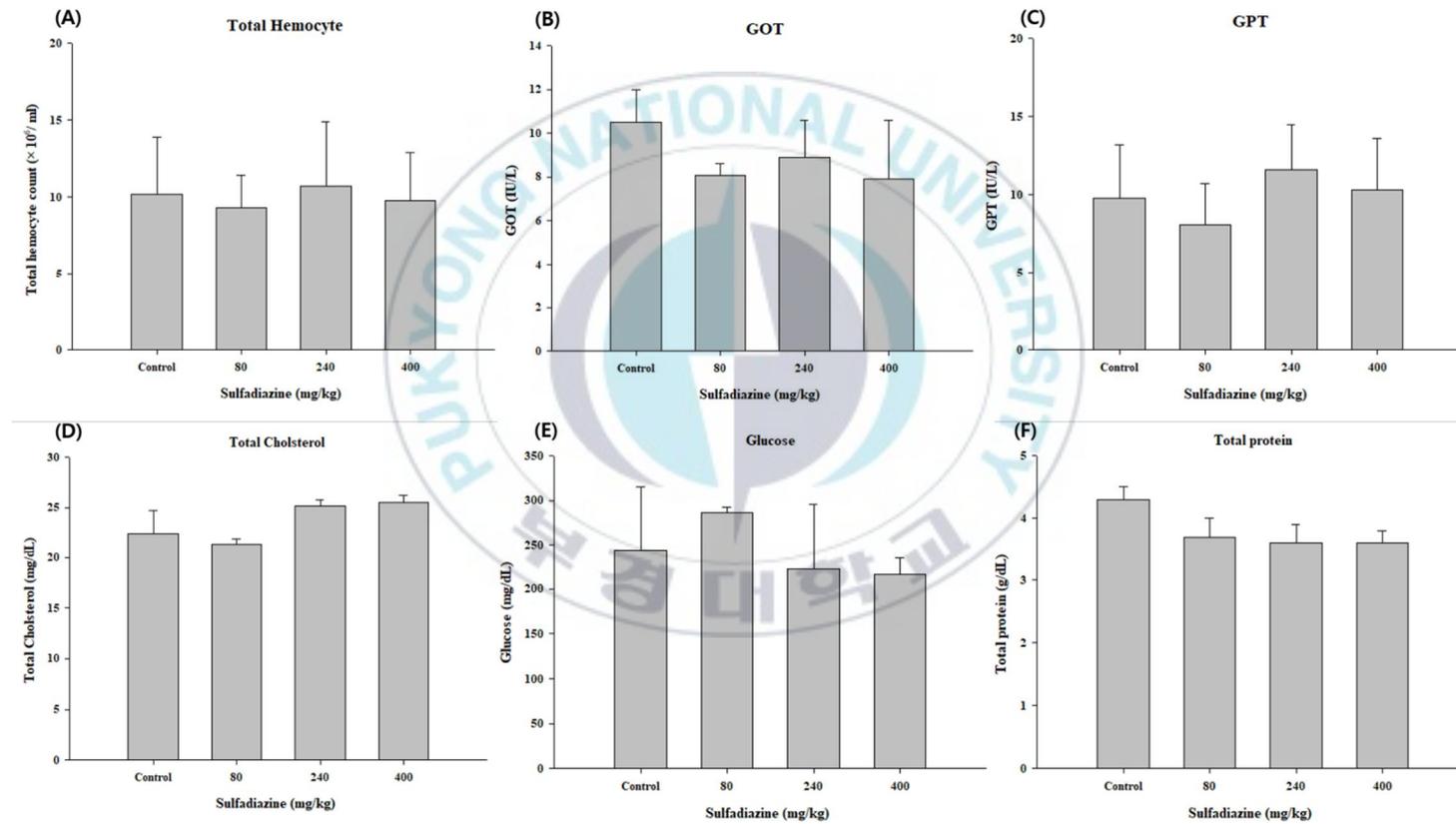
Table 10. Pharmacokinetic parameters of sulfadiazine in the hepatopancreas of *L. vannamei* after oral administration with doses of 80, 240 and 400 mg/kg for 7days at 28°C

Parameter (Unit)	80 mg/kg	240 mg/kg	400 mg/kg
$T_{1/2}$ (d)	9.73	10.70	10.32
T_{max} (d)	0	0	0
C_{max} (mg/kg)	2.04	3.20	14.36
$AUC_{0-\infty}$ (mg/kg·d)	2.48	3.57	10.7
$MRT_{0-\infty}$ (d)	3.31	3.18	1.233

5. 혈액 · 생화학적 지표 해석

28 ℃에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 혈액생화학적 독성 실험 결과를 Table 10. 에 나타내었다. 혈구개수는 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의미한 차이를 보이지 않았다. GOT의 경우, 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의미한 감소를 보였다. GPT의 경우, 대조군과 비교하여 80 mg/kg 경구투여군에서는 감소하는 경향을 보였으며 그에 반해 높은 농도군에서는 증가하는 결과를 보였다. Total Cholesterol 및 Glucose의 경우, 대조군과 비교하여 80 mg/kg 경구투여군에서는 감소하는 경향을 보였으며 그에 반해 높은 농도군에서는 증가하는 결과를 보였다. Total protein의 경우, 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의미한 감소를 보였다.

Fig. 8. Hematological parameters of *L. vannamei* hemolymph. (A): Total hemocyte, (B): GOT, (C): GPT, (D): Total cholesterol, (E): Glucose, (F): Total protein. (Mean \pm SD, n = 10)



6. 병리조직학적 독성 해석

28 ℃에서 sulfadiazine을 80, 240, 400 mg/kg의 농도로 흰다리새우에 경구투여 후 근육, 간췌장, 더듬이샘의 병리조직학적 독성 실험 결과를 조직별로 각각 Fig 9, 10, 11에 나타냈다. 모든 조직 및 농도에서 대조군과 비교하여 약물에 의한 특이적인 병리학적 증상이 나타나지 않았다.



Fig. 9. Micrographs of *L. vannamei* muscle were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration. A: Control, B: SDZ 80 mg/kg, C: SDZ 240 mg/kg, D: SDZ 400 mg/kg. Scale bar: A, B, C, D=50 μ m.

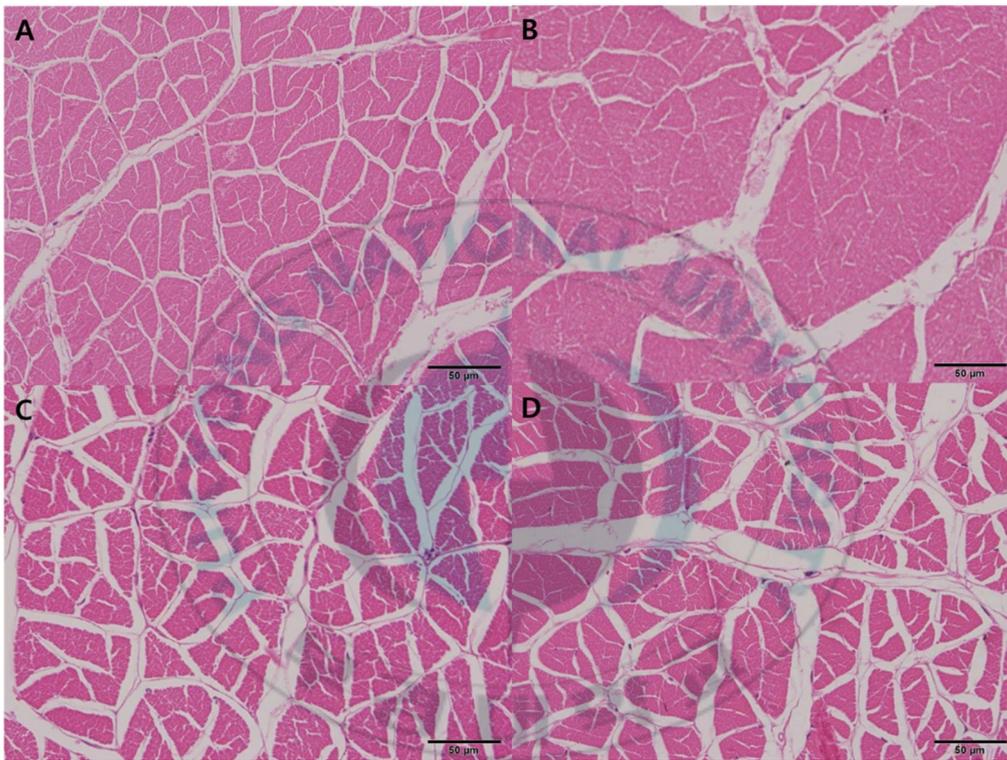


Fig. 10. Micrographs of *L. vannamei* hepatopancreas were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration. A: Control, B: SDZ 80 mg/kg, C: SDZ 240 mg/kg, D: SDZ 400 mg/kg. Scale bar: A, B, C, D=200 μ m.

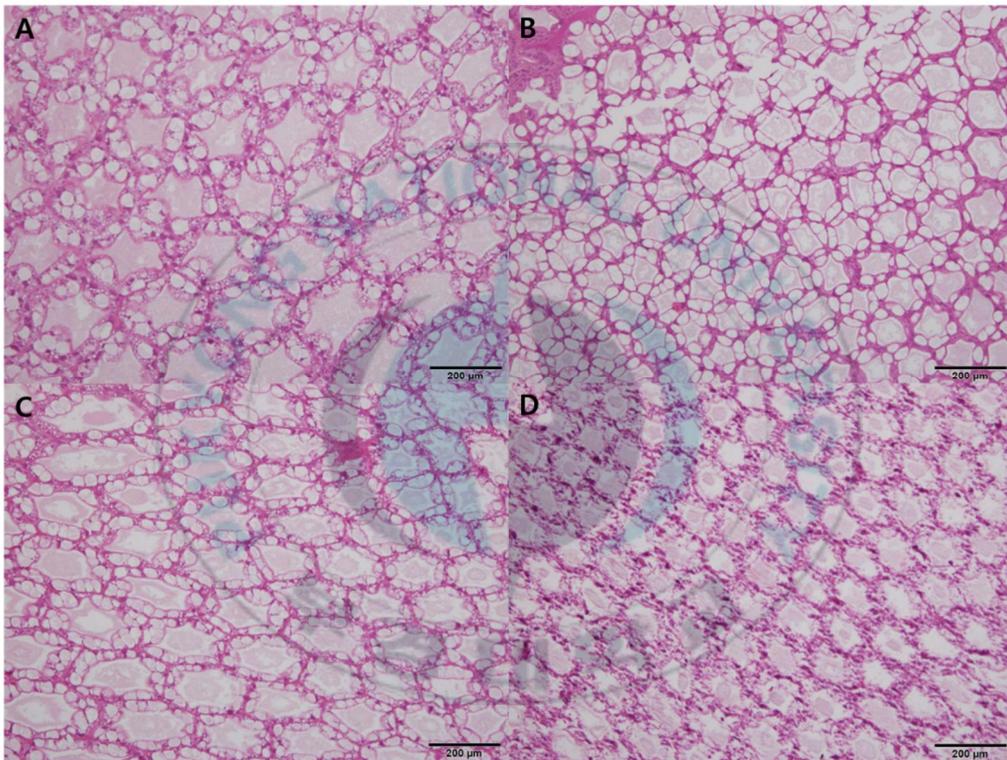
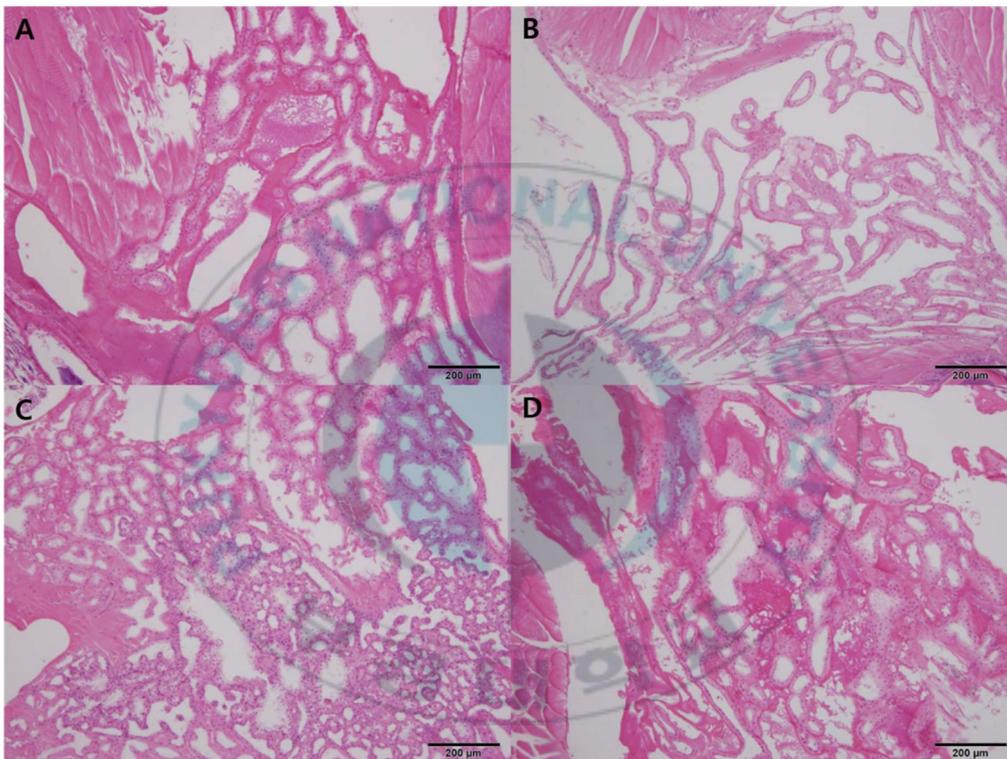


Fig. 11. Micrographs of *L. vannamei* antennal gland were isolated 1 day after 1 week sulfadiazine oral administration. A: Control, B: SDZ 80 mg/kg, C: SDZ 240 mg/kg, D: SDZ 400 mg/kg. Scale bar: A, B, C, D=200 μ m.



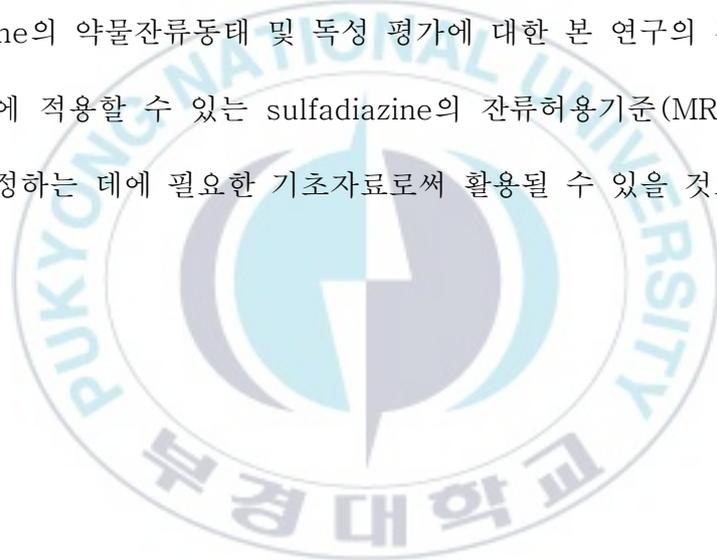
IV. 고찰

본 연구에서는 sulfadiazine의 경구투여에 인한 흰다리새우에 잔류하는 농도 변화 및 그에 따른 약동학적 분석을 진행하였으며 혈액생화학적 지표 및 병리조직학적 독성을 확인하였다. 흰다리새우에 대한 LC-MS/MS 전처리법은 Samanidou et al. (2016)에서 연구되어진 바 있다. 본 연구는 한국에서 사용하는 식품공전 (식품의약품안전처, 2020) 및 어류 체내 잔류물질 검사법 (국립수산과학원)을 활용하여 SPE 과정이 생략된 전처리법을 확립한 데에 의의를 가진다. Sulfadiazine의 경구투여에 따른 흰다리새우의 잔류 농도는 투여 농도가 높을수록 증가하는 양상을 보였으며 이를 통해 sulfadiazine은 흰다리새우에서 농도의존성을 가진다는 것이 확인되었다. 또한, 시간의 흐름에 따라 잔류 농도가 감소한다는 것을 확인하였다. 흰다리새우에서 sulfadiazine의 최고농도 (C_{max})는 hemolymph, muscle, hepatopancreas 순으로 높았다. Wang et al. (2016) 에서 mandarin fish (*S.chuatsi*) 에 120 mg/kg (SDZ/TMP = 5/1) 을 단회 경구 투여하였을 시 sulfadiazine의 최고농도 (C_{max})는 혈청, 근육, 신장, 간 순으로 높았으며 이 결과는 본 연구의 결과와 비슷한 양상을 보였다. Ma et al. (2017) 에서 white shrimp (*L.vannamei*) 에 100 mg/kg (83.3 mg/kg SMZ and 16.7 mg/kg TMP) 을 단회 경구 투여하였을 시 sulfamethoxazole의 최고

농도 (C_{max})는 간체장, 혈림프, 근육 순으로 높았으며 이 결과는 본 연구와는 다른 양상을 보였다. 이와 비슷하게 white shrimp (*L.vannamei*) 에 252 mg/kg (210 mg/kg SDM and 42 mg/kg OMP)을 경구 투여하였을 시 sulfadimethoxine의 최고농도 (C_{max})는 간체장, 혈림프, 근육 순으로 높은 결과를 보인 연구가 있다(Park et al., 1995). 종이 다르지만 같은 약물인 sulfadiazine을 투여하였을 시 결과가 비슷한 양상을 보였고 같은 종이지만 다른 약물인 sulfamethoxazole 및 sulfadimethoxine을 투여하였을 시 결과가 다른 양상을 보였다. 이를 통해 같은 sulfonamide계 약물이어도 종류에 따라 각 조직에 따른 대사 및 잔류 양상은 다르게 적용된다고 유추할 수 있다. 또한 흰다리새우에 sulfonamide계 약물을 경구투여한 경우 약물 투여 후 24시간이 지나면 그 잔류 농도가 0에 가까워지는 반면 어류에 경구투여한 경우에는 약물의 소실이 흰다리새우에 비해 아주 느리게 나타남을 알 수 있다(Wang et al., 2016; Park et al., 1995; Ma et al. ;2017). 모두 같은 약물이 아니라 정확한 비교는 불가능 하지만 본 연구에서도 약물의 소실이 0일과 1일 사이에 아주 빠르게 나타났기 때문에 어류에서보다 갑각류에서 sulfonamide계 약물의 소실이 빠르게 일어난다는 것을 알 수 있다. 때문에 갑각류에 sulfonamide계 약물을 투여할 시엔 다회 투여가 단회 투여보다 효과가 좋을 것이라고 판단된다. Sulfadiazine은 20 °C보다 28 °C에서 더 빨리 배출되는 양상을 보였다. 본 연구에서 흰다리새우

에 sulfadiazine을 경구 투여하였을 시 어류에 혈액생화학적 분석 결과, 각 지표에 따라 다른 결과를 나타냈다. Galindo-Reyes et al., 2000; Weixin et al., 1995에서 GPT의 혈장 중 농도는 갑각류에서 독성 발현의 결과 증가한다고 연구 되어져 있다. 본 연구에서 hemolymph를 이용한 혈액생화학적 분석 결과, GPT의 경우엔 대조군과 비교하여 높은 농도군에서 유의미한 증가가 나타난 것을 보아 독성이 발생했으므로 판단된다. Glucose의 경우, 대조군과 비교하여 80 mg/kg 경구투여군에서는 감소하는 경향을 보였으며 그에 반해 높은 농도군에서는 증가하는 결과를 보였다. 이 결과는 흰다리새우에 ammonia가 노출되었을 시 혈중 glucose의 농도가 높아진다는 연구와 비슷한 양상을 보였다(Cui et al., 2017). Total protein의 경우, 대조군과 비교하여 모든 농도에서 유의미한 감소를 보였다. 이 결과는 Chen et al., 1994에서 giant tiger prawn이 ammonia에 노출되었을 시 혈중 total protein의 농도가 감소한다는 연구 결과와 비슷한 양상을 보였다. 이를 토대로 순환여과식 구조의 특성 상 걸러지지 않은 노폐물에 의해 수중 ammonia 농도가 증가하여 glucose 및 total protein의 농도에 영향을 미쳤다고 유추하였다. 근육 및 간체장, 더듬이샘에 대한 병리조직학적 독성을 평가한 결과 sulfadiazine의 모든 농도에서 변화가 나타나지 않았다. 이 결과는 sulfadiazine에 의한 조직학적인 측면에서는 심각한 독성이 발생하지 않음을 의미한다. 결론적으로, 본 연구에서 sulfadiazine에 의한 흰

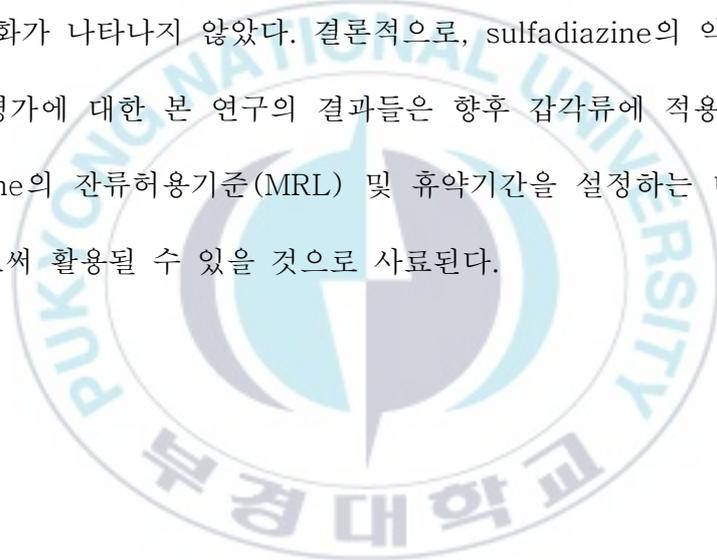
다리새우에의 여러 용량에서의 독성 발현 여부를 평가로 한 결과 400 mg/kg 투여 시 혈액생화학적 결과에서 약간의 독성이 확인되었다. 하지만 양식장에서 사용하는 sulfadiazine의 용량은 그보다 낮기 때문에 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 본 연구는 sulfadiazine 추출을 위한 흰다리새우의 조직 별 전처리법을 확립한데에 의미를 가진다. 추후 실험 시 필요에 따라 조직별로 효율적인 전처리법을 선택할 수 있도록 하였다. Sulfadiazine의 약물잔류동태 및 독성 평가에 대한 본 연구의 결과들은 향후 갑각류에 적용할 수 있는 sulfadiazine의 잔류허용기준(MRL) 및 휴약기간을 설정하는 데에 필요한 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.



V. 요약

본 연구는 sulfadiazine을 흰다리새우에 경구투여 하였을 때 발생하는 약물동태학적 및 독성학적 특성을 알아보기 위하여 수행되었다. 20 °C와 28 °C에서 sulfadiazine 80, 240, 400 mg/kg 이 흡착된 사료를 7일동안 경구 투여하여 실험을 진행하였다. Sulfadiazine의 경구 투여 후 채취한 근육, 혈림프, 간체장 조직에 있는 약물 잔류량을 LC-MS/MS를 이용하여 시간의 경과에 따라 분석하였다. 분석된 잔류량을 PK Solver에 적용하여 약물동태학적 특성을 알아보았다. 본 연구 결과 근육, 혈림프, 간체장에서 시간의 흐름에 따라 잔류량이 감소하였으며 sulfadiazine의 농도가 높을수록 잔류량이 유의적으로 증가하는 양상을 보였다. Sulfadiazine을 투여한 근육, 혈림프, 간체장에서 최고농도 도달시간(T_{max})은 모든 투여 농도군에서 0일로 나타났으며, 최고농도(C_{max})는 혈림프, 근육, 간체장 순으로 높았다. 모든 투여 농도군에서 sulfadiazine은 투여 종료 후 0일과 1일 사이에 많은 양이 배출되었으며 투여 종료 후 3일차에는 잔류 농도가 0.1 mg/kg 이하로 되었다. Sulfadiazine은 20 °C 보다 28 °C에서 더 빨리 배출되는 양상을 보였다. Sulfadiazine이 흰다리새우에 미치는 독성을 확인하고자 혈림프를 이용한 혈액생화학적 분석과 H&E 염색을 통한 조직병리학적 분석을 실시하였다. 혈액생화학적 지표 분석 결과, 혈구 개수는 대조군과 비교하

여 모든 농도에서 유의미한 차이를 보이지 않았다. GOT 및 total protein의 경우엔 대조군과 비교하여 모든 농도군에서 유의미한 감소를 보였다. GPT 및 total cholesterol, glucose의 경우엔 대조군과 비교하여 80 mg/kg 경구투여군에서는 감소하는 경향을 보였으며, 높은 농도군에서는 오히려 증가하는 경향을 보였다. 근육 및 간체장, 더듬이샘에 대한 병리조직학적 독성을 평가한 결과 모든 sulfadiazine 투여군에서는 대조군과 비교하여 변화가 나타나지 않았다. 결론적으로, sulfadiazine의 약물잔류동태 및 독성 평가에 대한 본 연구의 결과들은 향후 갑각류에 적용할 수 있는 sulfadiazine의 잔류허용기준(MRL) 및 휴약기간을 설정하는 데에 필요한 기초자료로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.



VI. 참고문헌

- [1] Romero, J., Feijoó, C. G., & Navarrete, P. (2012). Antibiotics in aquaculture—use, abuse and alternatives. *Health and environment in aquaculture*, 159.
- [2] Henry, R. J. (1943). The mode of action of sulfonamides. *Bacteriological reviews*, 7(4), 175
- [3] Connor, E. E. (1998). Sulfonamide antibiotics. Primary care update for ob/gyns, 5(1), 32–35.
- [4] Sköld, O. (2001). Resistance to trimethoprim and sulfonamides. *Veterinary research*, 32(3–4), 261–273.
- [5] Achari, A., Somers, D. O., Champness, J. N., Bryant, P. K., Rosemond, J., & Stammers, D. K. (1997). Crystal structure of the anti-bacterial sulfonamide drug target dihydropteroate synthase. *Nature structural biology*, 4(6), 490–497.
- [6] 국립수산과학원 전략양식부 수산방역과 (2018). 2018 수산용 의약품 제품 요약 해설집. pp. 97
- [7] Seafood Watch Staff. (2020). Thailand Intensive ponds. *Scandinavian Fishing Yearbook*

- [8] Cruz–Lacierda, E. R., Leobert, D., & Lumanlan–Mayo, S. C. (2000).
The Use of Chemicals in Aquaculture in the Philippines. Use of
Chemicals in Aquaculture in Asia, 155.
- [9] Thuy, H. T. T., & Loan, T. T. C. (2011). Antibiotic contaminants
in coastal wetlands from Vietnamese shrimp farming.
Environmental Science and Pollution Research, 18(6), 835–841.
- [10] Thitamadee, S., Prachumwat, A., Srisala, J., Jaroenlak, P.,
Salachan, P. V., Sritunyalucksana, K., ... & Itsathitphaisarn, O.
(2016). Review of current disease threats for cultivated penaeid
shrimp in Asia. Aquaculture, 452, 69–87.
- [11] Moriarty, D. J. (1999). Disease control in shrimp aquaculture
with probiotic bacteria. In Proceedings of the 8th international
symposium on microbial ecology (pp. 237–243). Atlantic Canada
Society for Microbial EcologyHalifax.
- [12] Holmström, K., Gräslund, S., Wahlström, A., Pongshompoo, S.,
Bengtsson, B. E., & Kautsky, N. (2003). Antibiotic use in shrimp
farming and implications for environmental impacts and human

health. International journal of food science & technology, 38(3), 255–266.

[13] 농림축산식품부 · 한국농수산물유통공사. (2019). 2019 년도
농림수산물 수출입동향 및 통계

[14] 식품의약품안전처 유해물질기준과 (2020)

[15] Xu, N., Fu, Y., Chen, F., Liu, Y., Dong, J., Yang, Y., ... & Ai, X. (2020). Sulfadiazine pharmacokinetics in grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) receiving oral and intravenous administrations. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics.

[16] Wang, W., Luo, L., Xiao, H., Zhang, R., Deng, Y., Tan, A., & Jiang, L. (2016). A pharmacokinetic and residual study of sulfadiazine/trimethoprim in mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) with single-and multiple-dose oral administrations. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 39(3), 309–314.

- [17] Lin, L. C., Fan, H. P., Liao, B. C., Yu, P. J., & Zhong, Q. F. (2010). Pharmacokinetics of sulfadiazine in European eels (*Anguilla anguilla*). *Journal of Inspection and Quarantine*, 20(4), 14–17.
- [18] 식품의약품안전처 (2020). 식품공전 제 8. 일반시험법
- [19] 국립수산물과학원 수산동물방역센터 (2000), 어류 체내 잔류물질 검사.
- [20] Samanidou, V., Bitas, D., Charitonos, S., & Papadoyannis, I. (2016). On the extraction of antibiotics from shrimps prior to chromatographic analysis. *Separations*, 3(1), 8.
- [21] Ma, R., Wang, Y., Zou, X., Hu, K., Sun, B., Fang, W., ... & Yang, X. (2017). Pharmacokinetics of sulfamethoxazole and trimethoprim in Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after oral administration of single-dose and multiple-dose. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 52, 90–98.

- [22] Park, E. D., Lightner, D. V., Milner, N., Mayersohn, M., Park, D. L., Gifford, J. M., & Bell, T. A. (1995). Exploratory bioavailability and pharmacokinetic studies of sulphadimethoxine and ormetoprim in the penaeid shrimp, *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 130(2-3), 113-128
- [23] Galindo-Reyes, J. G., Dalla Venezia, L., Lazcano-Alvarez, G., & Rivas-Mendoza, H. (2000). Enzymatic and osmoregulative alterations in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to pesticides. *Chemosphere*, 40(3), 233-237.
- [24] Weixin, Z., Hua, W., Jiang, J., & Dake, L. (1995). Effects of cadmium on transaminase activities and structures of tissues in freshwater giant prawn (*Macrobrachium rosenbergii*). [J]. *JOURNAL OF FISHERIES OF CHINA*, 1.
- [25] Cui, Y., Ren, X., Li, J., Zhai, Q., Feng, Y., Xu, Y., & Ma, L. (2017). Effects of ammonia-N stress on metabolic and immune function via the neuroendocrine system in *Litopenaeus vannamei*. *Fish & Shellfish Immunology*, 64, 270-275.

- [26] Chen, J. C., Chen, C. T., & Cheng, S. Y. (1994). Nitrogen excretion and changes of hemocyanin, protein and free amino acid levels in the hemolymph of *Penaeus monodon* exposed to different concentrations of ambient ammonia-N at different salinity levels. MARINE ECOLOGY-PROGRESS SERIES, 110, 85-85.



VII. 감사의 글

캡스톤 디자인을 통해 약리학 실험실에 처음 발을 디뎠을 때가 엇그제 같은데 벌써 졸업을 하게 되었네요. 실험실에 제 자리가 생기고 학교에 오면 가장 먼저 실험실에 출근하며 실험실의 일원으로써 소속감을 느낄 수 있었어요. 학부생 때 실습 수업을 통해서만 실험을 접했기 때문에 처음에는 많이 낯설고 실험을 망치면 어떡하지 두려움도 많이 들었지만 많은 분들의 도움을 받아 석사진학까지 하여 졸업을 앞두게 되었습니다.

먼저 정준기 교수님, 교수님을 처음 뵈었던 학부 면접 때가 생각이 납니다. 웬지 모르게 친근감이 느껴졌고 하얀 머리카락이 제가 떠올리던 학자의 모습과 비슷해서 교수님께 많은 것을 배우고 싶다고 생각했어요. 궁금한 것이 많고 아는 것이 없었기에 이것 저것 여쭙봐도 항상 웃으면서 알려주셔서 정말 감사했습니다. 교수와 제자 사이지만 교수님께서 친근하게 대해 주셔서 어려움 없이 편하게 대화하고 의견을 나눌 수 있었습니다. 덕분에 많은 것을 배우고 얻어가는 것 같아요. 수산생명의학과 모든 교수님들께도 알기 쉽게 많은 것을 가르쳐 주신 것에 대해 감사함을 전합니다.

거의 3년동안 같은 실험실에서 동고동락하며 모르는 부분은 같이 찾아보고 역할 분담해서 실험했던 우리 실험실 식구들. 주안이 오빠, 현호오빠나 혼자였으면 여기까지 못 왔을 거야. 여러 의견으로 내가 틀린 부분은 고쳐주고 보완해줘서 고마워. 덕분에 많이 배웠어. 이제는 졸업해서 자주 못 보겠지만 안부 물으며 지내자.

약리방 선배 수지언니! 실험실 생활을 해보니 이 많은 것들을 어떻게 혼자 해내며 버티셨을까 대단함을 느껴요. 많이 알려주시고 챙겨 주셔서 졸업할 수 있게 되었습니다. 감사해요. LC/MS-MS 조작법 알려주시고 같이 실험해 주신 공실관 황인자 선생님 감사합니다 덕분에 실험 잘 마쳤어요. 과제하는 데에 있어서 모르는 부분 많이 알려주신 이지훈 박사님께도 감사함을 전합니다.

캡스톤 디자인 같이 했던 우리 준우 오빠, 상진이 오빠 지금은 다른 길을 걷고 있지만 준우 오빠는 박사 파이팅하고 상진이 오빠는 꼭 오빠가 하고자 하는 일 하길 바랄게!! 덕분에 재밌었어.

대학 생활 동안 같이 밥 먹고 수업 듣고 공부한 우리 영트리오! 나영이, 선영이 언니, 혜영이 나랑 같이 대학 생활해줘서 고마워. 앞으로도 각자의 자리에서 항상 파이팅하자!

자주 연락은 안하지만 가끔 만날 때 마다 재밌는 수정이, 소연이, 예빈이 너네랑 이렇게까지 오래 친하게 지낼 줄은 몰랐는데 이제 너네가 없으면 안 될 정도로 친해졌네. 우리가 만난지 벌써 10년이 되어가. 앞으로도 재밌게 지내자!

우리 병리방 식구들 다혜, 효은이 오빠, 노을이 그리고 보성 선배, 지원이 언니! 회식도 같이 하고 서로 필요한 것들 나눠가며 재밌게 실험실 생활할 수 있게 해줘서 고마웠어요. 다혜랑 노을이는 실험실 잘 가꿔나갈거라고 믿어. 효은이 오빠도 졸업하고 오빠가 계획한 것들 다 이룰 수 있기를 바래

했수로 6년째 내 옆에서 내 투정을 받아주는 남자친구 수민이. 수민이가 아니었더라면 힘든 일이 있을 때 마다 이야기할 사람도 없어서 많이 슬펐을 거야. 내 이야기 들어주고 공감해줘서 고마워. 많이 엉뚱하고 천방지축인 나한테 맞춰주느라 항상 고생인 수민이 앞으로도 잘 부탁해! 수민이도 졸업 후 하고자 하는 일들 다 이루어지길 내가 옆에서 응원할게. 마지막으로 우리 가족 엄마, 아빠, 동생 모두 철부지 첫째 때문에 고생하고 투정 부려도 다 받아줘서 고마워. 벌써 내가 대학원 졸업을 하게 되었는데. 앞으로 더 열심히 해서 맛있는 거 많이 사줄게 사랑해!

그 외에도 고마움을 전하고 싶은 분들이 많지만 모두 적을 수 없어 마음으로나마 감사함을 전합니다. 부경대학교에 발을 들인지 6년만에 떠나게 되네요. 마음이 싱숭생숭하지만 많은 것을 배웠고 그것을 토대로 최선을 다해 열심히 살아가도록 하겠습니다. 감사합니다.