

시료고체상분산(matrix solid phase dispersion)전처리법과 액체크로마토그래피를 이용한 돈육중 enrofloxacin 및 ciprofloxacin 분석

강환구 · 손성완 · 이혜숙 · 김재학 · 조명행*

수의과학연구소
서울대학교 수의과대학*
(1996년 4월 25일 접수)

Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and HPLC determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pork muscle tissue

Hwan-goo Kang, Seong-wan Son, Hye-sook Lee, Jae-hak Kim, Myung-haing Cho*

*National Veterinary Research Institute
College of Veterinary Medicine, Seoul National University**

(Received Apr 25, 1996)

Abstract : A method for the isolation by matrix solid phase dispersion method and liquid chromatographic determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pork muscle tissue is presented.

Blank or enrofloxacin and ciprofloxacin spiked samples(0.5g) containing 0.05g oxalic acid were blended with C₁₈(octadecylsilyl derivatized silica) packing material. After homogenization, C₁₈/muscle tissue matrix was transferred to glass column made from 10ml glass syringe and filter paper, and compressed to 4~4.5ml volume. A column was washed with 8ml of hexane and dried under vacuum. Interfering materials were removed by ethylacetate 8ml and dried, following which enrofloxacin and ciprofloxacin were eluted with 8ml of methanol under gravity. The eluate containing enrofloxacin and ciprofloxacin was free from interfering compound when analysed by HPLC with UV detection at 278nm.

Enrofloxacin and ciprofloxacin showed linear response with UV detector at the range of 0.05~1.0µg/ml and eluted within 5ml elution volume of methanol from the matrix. Fortified sample containing 0.05g oxalic acid represented more good recoveries than that of control sample.

Address reprint request to Dr. Hwan-goo Kang, National Veterinary Research Institute, Anyang, Korea.

Average percentages of recovery of enrofloxacin and ciprofloxacin were $93.30 \pm 4.56\%$ and $91.84 \pm 4.17\%$, respectively, for the concentration range (0.05, 0.1, 0.25, 0.5 and $0.75 \mu\text{g/g}$). The interassay variability of enrofloxacin was $6.02 \pm 5.33\%$ with an intra-assay variability of 4.89% and $6.75 \pm 2.68\%$ with 4.54% for ciprofloxacin. Detection limit of enrofloxacin and ciprofloxacin was $0.030 \mu\text{g/g}$ in the spiked sample.

Key words : enrofloxacin, ciprofloxacin, pork muscle, MSPD, HPLC.

서 론

Enrofloxacin과 ciprofloxacin은 fluoroquinolone 계열의 합성 항균제로서 그람음성균과 일부 그람양성균에 대하여 살균효과가 뛰어난 뿐만 아니라 마이코플라스마속의 균에도 효과가 있는 항균물질로 세균에서 supercoiling을 풀어서 DNA 전사에 관여하는 topoisomerase II(DNA gyrase)를 억제하여 살균작용을 나타내며, 다단계변이(multistep mutation)에 의해 내성이 유발되므로 내성균의 출현가능성이 낮은 것으로 보고되어 있다¹⁻³.

일본, 프랑스 및 노르웨이에서는 이 계열의 항균제를 주로 양식어류의 질병을 예방시킬 목적으로 사용하고 있으며 최근에는 돼지, 닭, 송아지에서도 사용되고 있는 추세이다⁴. 그러나 이러한 합성항균제에 대한 독성 및 잔류허용한계(MRL; maximum residue level)에 대하여는 많은 연구가 되어있지 않다. 유럽에서는 enrofloxacin과 ciprofloxacin에 대한 잔류허용한계가 간장과 근육에서 30ppb(EEC Regulation No 2701/94)로 설정되어 있으며, 스위스에서는 oxolonc acid와 enrofloxacin에 대한 잔류허용한계가 우유, 계란 및 식육에서 10ppb로 설정되어 있다⁵. 그러나 미국과 일본은 이에 대한 잔류허용한계가 미설정되어 있다. 현재 국내에서는 제 1세대 quinolone 계열의 합성항균제 뿐만 아니라 enrofloxacin, ciprofloxacin, danofloxacin, norfloxacin, ofloxacin 및 pefloxacin 등이 양어 및 동물의 질병치료와 예방을 목적으로 허가되어 있어 사용량의 증가가 예상되나 이러한 물질에 대한 분석방법 및 잔류허용한계는 설정되어 있지 않다. 현재까지 식육이나 어육중에서 quinolone 계열의 합성항균제를 추출하고 분석하는 공인된 방법은 없으나, 미생물학적인 방법⁶과 액체크로마토그래피법^{7,8}이 널리 사용되고 있으며 액체크로마토그래피법에는 전처리시에 액상추출법⁷이나 고체상추출법(solid phase ex-

traction)⁸을 사용하는 방법들이 보고되어 있다. 그러나 이러한 방법은 전처리시에 시간이 많이 소요되며 유기용매의 소모가 많다는 단점이 있다. Barker 등이 이러한 단점을 극복하기 위한 방법으로 시료고체상분산(MSPD; matrix solid phase dispersion) 전처리 방법을 보고한 이후, 이와같은 전처리 방법은 식육⁹⁻¹², 어육^{13,14}, 지방¹⁵, 우유¹⁶⁻¹⁸ 및 간장¹⁹⁻²⁰ 등에서 유기염소계 농약¹², 테트라사이클린 계열 항생제¹¹, 니카바진¹⁰, 푸라졸리돈¹¹, chlorsulfuran¹⁷, benzimidazole^{18,19} 및 ivermectin²⁰ 등을 분리정량하는 방법들에 적용되고 있다. 시료고체상분산전처리법은 시료와 고체상을 직접 갈아서 반응시키고 소량의 용매를 이용하여 용출하기 때문에 전처리 시간이 적게 걸리고 시료조작이 매우 간편하다는 장점이 있다. 본 실험은 시료고체상분산(MSPD) 전처리법을 이용하여 돼지고기중의 enrofloxacin과 ciprofloxacin을 추출정제하고 자외부 검출기를 이용하여 분석하는 방법을 최초로 정립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

표준품 및 시약 : Enrofloxacin (99.8%)은 한국바이엘화학에서 공여받았으며 ciprofloxacin (100.2%)은 (주)제일제당에서 생산한 것을 구하여 사용하였고, 분석에 사용한 n-Hexane, methanol, ethylacetate, acetonitrile 및 dichloromethane 등의 유기용매는 HPLC급을 그리고 disodium EDTA, phosphoric acid(85%), triethylamine, 및 oxalic acid 등은 순수 시약급을 사용하였다.

컬럼충진제 및 활성화 : Bulk C₁₈ (J.T Baker, USA)을 구입하여 4배의 hexane, dichloromethane 그리고 methanol 순으로 세척하여 불순물을 제거한 후 진공을 이용해 수분을 완전히 제거하여 사용하였다.

표준용액의 조제 및 표준곡선의 작성

혼합 표준원용액 : Enrofloxacin과 ciprofloxacin을 각각 10mg(base)씩 정확히 달아 methanol로 100 μ g/ml이 되도록 만든후 소량으로 나누어 -20 $^{\circ}$ C에 보관하면서 사용하였다.

혼합 표준사용용액 : 혼합 표준원용액을 각각 1ml씩 취해 이동상으로 10 μ g/ml 되도록 만들어 냉장보관하면서 7일간 사용하였다.

표준곡선의 작성 : 혼합 표준사용용액을 이용해 이동상으로 50, 100, 250, 500, 1000 μ g/ml 용액으로 만들고 50 μ l씩 HPLC에 주입한 다음 농도에 대한 면적비로서 표준곡선을 작성하였다.

분석조건 : HPLC는 photodiode array 검출기가 장착된 Spectraphysis사 system(USA)을 사용하였으며 컬럼은 μ -bondapak C₁₈ (300 \times 3.9mm id, Waters, USA)를, 이동상용매는 phosphoric acid와 triethylamine을 각각 4ml씩 첨가시킨, D.W: acetonitrile: methanol(800 : 170 : 30, v/v/v) 혼합용액을 0.45 μ m 여과하여 사용하였으며, 분석과장은 자외부 278nm, 유속은 1.2ml/min 그리고 측정감도는 0.005AUFS로 하였다.

Enrofloxacin과 ciprofloxacin 용출용매 선택 : Methanol, acetonitrile 및 ethylacetate 각각 8ml에 10 μ g/ml의 혼합 표준사용용액을 100 μ l씩 첨가후 60 $^{\circ}$ C의 진공감압회전농축장치(Enviromental speed vac., USA)에서 농축 건조하고, 이동상용매 1ml로 녹여 원심후 여과하여 50 μ l씩 HPLC에 주입하여 표준품의 피크면적에 대한 비율을 구하였다.

EDTA 및 oxalic acid의 첨가가 회수율에 미치는 영향 : 0.05g의 EDTA와 oxalic acid를 혼합 혹은 단독으로 첨가시킨 돈육시료와 첨가하지 않은 시료에 혼합표준용액을 0.5 μ g/ml가 되게 첨가시킨 후 돈육중 추출·정제방법에 따라 methanol을 elution용매로 하여 용출후 HPLC에 주입하여 각각의 용매에 대한 회수율을 구하였다.

용출용매에서 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 용출양상 : Enrofloxacin과 ciprofloxacin이 잔류하지 않은 얇게 자른 조직 0.5g에 10 μ g/ml의 혼합 표준사용용액을 100 μ l씩 첨가후 돈육중 추출정제과정에 따라 정제후 methanol 9ml로 용출시키면서 1.0ml씩 분획을 받아 농축건조시킨 후 이동상 1ml로 녹여 HPLC에 주입한 다음, 각분획에 대한 면적을 구하여 전체 면적합에 대한 각 분획의 비율을 구하였다.

돈육중 enrofloxacin과 ciprofloxacin 추출·정제 : 추출·정제방법은 Barker 등의 방법을 응용하였는데 세

척용매 및 용출용매는 실험을 통하여 선정된 것을 사용하였다. 즉 EDTA와 oxalic acid를 각각 0.05g 달아 유리유발에 넣은 다음 미리 활성화시킨 C₁₈ bulk를 2g 넣고 수술용 칼을 이용하여 냉동된 조직을 되도록 지방이 포함되지 않게 얇게 썰어 0.5g을 넣은후 혼합표준사용용액을 첨가한 다음, 유봉을 이용하여 무리한 힘을 가하지 않고 원을 그리면서 0.5~1 분간 균질화 시켰다. Whatmann No. 1 거름종이를 직경 15mm되게 잘라 10ml의 유리주사기 밑에 밀착시켜 넣고 균질화시킨 시료 전량을 조심스럽게 부은 후 다시 그 위에 같은 크기의 거름종이를 올려놓고 피스톤을 이용해서 부피가 4~4.5ml이 되도록 압착시켰다. 다시 주사기 끝에 200 μ 마이크로피펫팁을 잘라서 끼우고 8ml의 hexane으로 중력하에서 지방을 제거하고 진공매니폴드(vacuum manifold)로 옮겨 진공을 이용해 남아있는 hexane을 완전히 제거하였다. 이후 다시 ethylacetate 8ml로 재 세척하고 진공을 이용하여 남아있는 용액을 완전히 제거하였다. 여기에 methanol 8ml 넣고 중력을 이용해 유출시켜 시험관에 받아 60 $^{\circ}$ C의 진공감압회전농축기에서 농축건조시키고 이동상 0.5ml을 넣고 균질화시킨 후 5분간 초음파세척기에서 sonication시켰으며, 균질액을 에펜돌프 튜브에 옮겨 13,000 \times g/10min 원심분리후 상층액을 0.45 μ m 디스크 필터로 여과하여 HPLC 주입하였다.

Data 분석 : 표준곡선은 농도와 각각의 농도에서 피크면적의 평균값을 이용해 작성하였으며 회수율은 각각의 첨가시킨 시료에서 피크면적을 표준곡선식에 대입하여 농도를 구하여 첨가시킨 농도에 대한 백분율로 구하였다. 각각의 농도(50, 100, 250, 500, 750ng/g)에서 6개의 첨가시료에 대한 피크면적을 표준곡선식에 대입하여 회수율을 구한후 평균과 표준편차를 구하였다. 표준편차를 각각의 평균으로 나누고 100을 곱하여 변이계수(coefficient of variation)를 구하였다. 실험간변이(interassay variability)는 각각의 농도에서 변이계수의 평균과 표준편차로 나타내었으며, 실험내변이(intraassay variability)는 각각의 농도에서 6개 시료에 대한 평균값의 변이계수로서 나타내었다.

결 과

Enrofloxacin과 ciprofloxacin 표준곡선 : 이동상으로 50~1000ng/ml되게 만든후 HPLC 주입하여 자외부검출기(278nm)를 이용하여 농도에 대한 피크면적비를 구하고 표준곡선을 작성한 결과 enrofloxacin과ciprofloxacin 모두

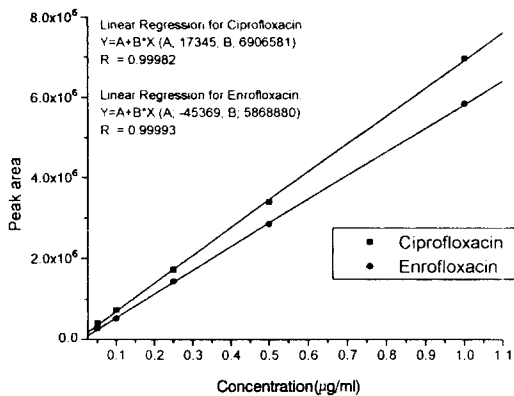


Fig 1. Standard curve of enrofloxacin and ciprofloxacin in the UV detection at 278nm. HPLC condition ; column, μ -bondapak C_{18} (3.9 \times 300mm, i.d.), mobile phase, D.W.-acetonitrile-methanol(800:170:30, v/v/v) containing 4ml triethylamine and 4ml phosphoric acid, flow rate, 1.2ml/min, injection volume, 50 μ l.

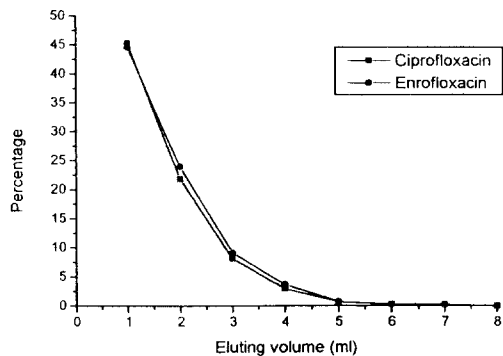


Fig 2. Elution profile of enrofloxacin and ciprofloxacin with methanol from C_{18} phase and muscle tissue homogenated column.

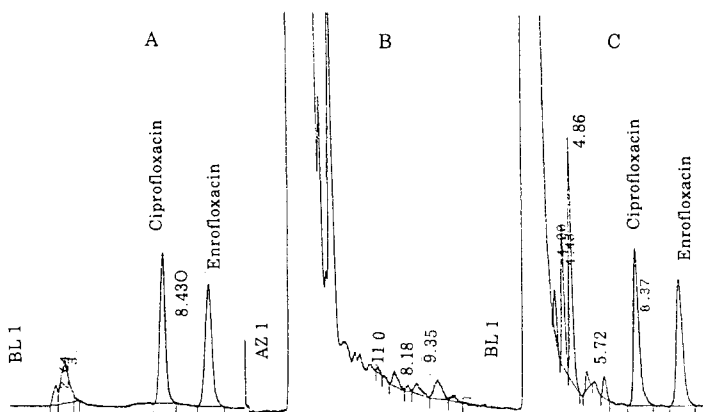


Fig 3. (A); Chromatogram of standard enrofloxacin and ciprofloxacin, 12.5ng(250ng/ml) of ciprofloxacin and enrofloxacin, respectively, (B); Chromatogram of blank pork muscle tissue, (C); Chromatogram of pork muscle tissue fortified with enrofloxacin and ciprofloxacin at 0.25 μ g/g. HPLC condition; column, μ -bondapak C_{18} (3.9 \times 300mm, id), mobile phase, D.W.+ acetonitrile+ methanol (800:170:30, v/v/v) containing 4ml of triethylamine and phosphoric acid, flow rate, 1.2ml/min, detected at 278nm.

양호한 직선성(enrofloxacin; R = 0.9999, ciprofloxacin; R = 0.9998)을 나타내었다(Fig 1).

용출용매 : Methanol, acetonitrile 및 ethylacetate 각각에 대하여 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 용출능을 비교한 결과 methanol을 용출용매로 사용시 회수율이 88.8%로 다른 용매들보다 매우 높은 회수율을 나타내어 용출용매로서 가장 적합하였다(Table 1).

EDTA와 oxalic acid의 첨가시 회수율 : 돈육에 oxalic acid를 0.05g 단독으로 첨가시키거나 EDTA와 oxalic acid를 각각 0.05g씩 첨가시에는 Table 2에서 보는 바와 같이 90% 이상의 높은 회수율을 나타낸 반면, 첨가하지 않았을 때와 EDTA만을 첨가할 경우는 낮은 회수율을 나타내어 oxalic acid를 첨가시에 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 회수율이 매우 증가함을 알 수 있었다.

Table 1. Recover rates of enrofloxacin and ciprofloxacin with three eluting solutions

Eluting solution	Fortified amount ($\mu\text{g/g}$ tissue)	Recovery rate (% , mean, n=2)	
		Enrofloxacin	Ciprofloxacin
Acetonitrile	0.5	9.26	10.99
Methanol	0.5	94.71	88.82
Ethylacetate	0.5	ND	ND

ND ; not detected

Table 2. Recovery rates of enrofloxacin and ciprofloxacin in fortified pork muscle tissue depend on the presence of EDTA and oxalic acid

Added compound	Fortified amount ($\mu\text{g/g}$)	Recovery rate (% , mean \pm SD, n=3)	
		Enrofloxacin	Ciprofloxacin
EDTA	0.5	78.63 \pm 4.43	45.40 \pm 7.40
Oxalic acid.	0.5	90.64 \pm 4.21	98.54 \pm 5.70
EDTA/Oxalic acid.	0.5	94.31 \pm 17.32	90.60 \pm 8.2
Not added	0.5	47.94 \pm 18.52	24.79 \pm 14.00

Table 3. Recovery rates of enrofloxacin and ciprofloxacin isolated from fortified pork muscle tissue

Fortified amount ($\mu\text{g/g}$)	Recovery rate [% , mean (CV), n=6]	
	Enrofloxacin	Ciprofloxacin
0.05	93.44 (14.74)	88.06 (11.24)
0.1	87.29 (3.53)	90.97 (6.90)
0.25	90.39 (1.29)	88.01 (4.92)
0.5	92.13 (7.25)	90.57 (6.11)
0.75	97.34 (3.29)	97.44 (4.56)
Mean recovery(SD), %	93.30 (4.56)	91.84 (4.17)
Intraassay variation, %	4.89	4.54
Interassay variation(SD), %	6.02 (5.33)	6.75 (2.68)

CV ; coefficient of variation, SD ; Standard deviation

Methanol에 의한 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 용출양상 : 시료에 enrofloxacin과 ciprofloxacin을 첨가후 용출시 두 가지 물질 모두 용출되는 부피가 5ml이전에서 98%이상 용출되었다(Fig 2). 이러한 결과를 종합하여 8 ml을 적합한 용출용매의 양으로 정하였다.

Enrofloxacin과 ciprofloxacin의 크로마토그램 및 첨가 돈육중에서 회수율 : 돈육에 enrofloxacin과 cipro-

floxacin 혼합표준액을 첨가후 돈육중 추출정제법에 따라 추출정제후 HPLC에 주입하여 얻은 크로마토그램은 Fig 3에서 보는 것과 같이 ciprofloxacin과 enrofloxacin 모두 방해피크없는 깨끗한 크로마토그램을 나타내었다. 이와같은 과정으로 돈육에 enrofloxacin과 ciprofloxacin을 각각 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 $\mu\text{g/g}$ 첨가후 각각에 대하여 회수율을 구한 결과 enrofloxacin은 87.29~97.34% 그리고 cipro-

floxacin은 88.01~97.44%의 양호한 회수율을 나타내었으며, 변이계수는 enrofloxacin은 1.29~14.74% 그리고 ciprofloxacin은 4.56~11.24%이었고, interassay variability는 4.89%와 4.54%이었으며, 실험에 사용된 분석기와 밀접한 관계가 있는 intraassay variability는 각각 6.02%와 6.75%이었다.

고 찰

Enrofloxacin과 ciprofloxacin은 국내에서 가축질병의 치료제로 사용되고 있을 뿐만아니라 enrofloxacin은 사료첨가제로서도 사용이 되고 있어 식육중에서 이들 물질의 잔류가능성이 매우 높으나 이들 물질에 대한 분석법 및 잔류에 대한 연구는 부족한 실정이다. 현재까지 식육중에서 quinolone계열의 합성항균제를 추출하는 방법은 계단백후에 유기용매층으로 전이시키는 액상추출법이나 추출용매로 추출하고 카트리지를 이용해 정제하는 SPE (solid phase extraction)방법들이 알려져 있다. 그러나 이러한 방법은 유기용매의 소요가 많으며 번거롭고 시료 전처리 시간이 많이 소요되기 때문에 다량의 시료를 동시에 분석하는데는 적합하지 않다. 이러한 단점을 극복하기 위해 최근에 Barker 등은 시료와 고정상을 직접 갈아서 유리시린지에 packing하고 지방을 제거한 후 용출용매로 추출하는 MSPD (matrix solid phase dispersion)방법을 보고하였다⁹⁻²⁰. 이러한 방법은 0.5g의 시료와 2.0g의 C₁₈을 혼합하여 유발에서 균질화시키는데 이때 시료와 C₁₈간의 반응면적은 약 1,000m²에 해당되며 여기에 혼합시의 기계적인 힘과 소수성힘이 합쳐져 시료와 C₁₈이 매우 수월하게 반응한다는 것과 지방이나 비극성 물질은 비극성인 C₁₈에 붙게되나 단백질이나 극성인 물질은 C₁₈의 말단에 노출되게 된다는 점을 이용한 시료전처리 방법이다. 이러한 방법은 세척용매와 용출용매를 알맞게 선택시 시료전처리 과정이 매우 간단하며 회수율이 높을 뿐만 아니라 시간이 짧게 소요되므로 다수의 시료에 대하여 잔류물질을 신속하게 검사할 수 있는 매우 간편한 방법이다. Enrofloxacin과 ciprofloxacin은 구조 자체에 형광을 띠는 F기를 가지고 있어 형광검출기를 이용하여 검출하는 방법^{4,7-8}이 보고되어 있다. 본 실험에서는 두 가지 물질이 모두 자외부 278 nm에서 최대의 흡광도를 갖기 때문에 자외부 검출기를 이용하여 분석한 결과 검출능이 양호하였으며, 0.05~1.0µg/ml 농도 범위

에서 양호한 직선성을 나타내었다(Fig 1). 시료에 oxalic acid나 EDTA를 첨가하지 않았을 경우는 시료/C₁₈로부터 enrofloxacin과 ciprofloxacin가 용이하게 분리되지 않았으나 0.05g의 oxalic acid를 시료에 첨가하는 양호한 분리율을 나타내었다(Table 1). 이러한 결과는 식육중 테트라사이클린을 MSPD전처리하는 경우¹¹와 비슷하였다. 이러한 이유는 oxalic acid가 무기이온들과 잘 결합하며, 시료/C₁₈혼합체의 pH를 낮추어주어 enrofloxacin과 ciprofloxacin가 용출용매에 잘 녹게 해주기 때문으로 추정된다. 용출용매는 methanol이 acetonitrile이나 ethylacetate보다 시료/C₁₈혼합체로부터 월등히 양호하게 enrofloxacin과 ciprofloxacin를 분리하였기 때문에 methanol로 정하였으며, 용출되는 양은 5ml이전에 98%이상의 enrofloxacin과 ciprofloxacin용출되어(Fig. 2) 8ml이 적당하였다. C₁₈과 시료로 제조된 컬럼에서 hexane을 이용하여 지방을 제거하고 건조시킨 후 methanol로 용출시는 enrofloxacin과 ciprofloxacin이 양호하게 용출되었으나 본 실험의 분석 조건하에서 50µl를 HPLC에 주입시는 방해물질로 인하여 base선이 분석시간내에 안정되지 않았으나 hexane으로 세척건조 후 다시 ethylacetate 8ml로 재세척시는 비교적 base선이 안정되었다. 용출액을 60℃에서 농축시는 소량의 흰색분말이 용기의 바닥에 남아있었으나 이동상에 쉽게 녹았고, 시험관을 초음파로 녹일 경우 균질화되었다. 이후 다시 원심분리(1,300×g)시는 깨끗한 상층액을 얻을 수 있었고 0.45µm필터로 쉽게 여과되었다. 이렇게 얻은 여과액을 HPLC에 주입하고 자외부 278nm에서 검출시는 Fig 3에서 보는 것과 같이 대조시료는 방해피크가 존재하지 않았으며, 첨가시료에서도 깨끗한 chromatogram을 얻을 수 있었다. 유속을 1.2ml/min, 주입량을 50µl로 하였을 경우 검출기의 검출감도는 1.5ng(30ug/ml, 30ug/g tissue)이었다. 돈육중 enrofloxacin과ciprofloxacin을 MSPD전처리후 HPLC/UV분석하는 방법이 분석법으로서의 적합성을 조사하기 위하여 대조시료에 농도별첨가시료(0.05, 0.1, 0.25, 0.5 및 0.75µg/g)를 제조하여 분석한 결과 전체분석농도범위에서 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 평균회수율과 표준편차는 각각 93.40±4.56%와 91.84±4.17%로 매우 우수하였으며, 실험간변이(interassay variability)와 표준편차는 각각 6.02±5.33%와 6.75±2.68로 우수하였고, 분석기와 관계가 있는 실험내변이(intra-assay variability)는 각각 4.89%와 4.54%로 양호하였다.

이러한 MSPD전처리 방법은 작은량(0.5g)의 시료를 이용하며 시료전처리 단계가 간단하여 전처리시간이 절약되고 적은 양의 유기용매(8ml)를 사용하기 때문에 기존의 액상추출법이나 고체상추출법(solid phase extraction)과 비교해 매우 간편하고 경제적인 방법이다. 또한 이러한 방법은 시료를 빠르게 전처리할 수 있고 방해물질이 적은 용출물을 얻을 수 있기 때문에 높은 회수율을 요하는 효소면역학적방법 등에도 유용하게 적용될 수 있는 방법이다. 이러한 장점때문에 이 방법은 기존의 분석법을 대체하는 효과뿐만 아니라 많은 수의 시료에 대하여 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 잔류여부를 신속하게 분석할 수 있는 방법으로 유용하게 쓰일 것으로 사료된다.

결 론

돈육중에 잔류되는 enrofloxacin과 ciprofloxacin을 시료고체상분산(MSPD)전처리법을 이용하여 추출하고 자외부검출기를 이용한 액체크로마토그래피법으로 정량하는 실험을 한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Enrofloxacin과 ciprofloxacin은 자외부 검출기에 대하여 양호한 반응성을 나타냈으며, 각각의 농도별 표준곡선도 양호한 직선성을 나타내었다.

2. Methanol이 C₁₈/식육으로부터 enrofloxacin과 ciprofloxacin을 가장 우수하게 용출시켰으며 oxalic acid를 시료에 첨가할 때 2배이상의 회수율의 증가를 나타내었다.

3. 시료고체상분산전처리과정의 세척단계에서 hexane으로 세척후 ethylacetate로 재세척할 경우는 base선이 안정된 크로마토그램을 얻을 수 있었다.

4. 돈육중 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 평균회수율과 표준편차는 첨가농도(0.05, 0.1, 0.25, 0.5 및 0.75µg/g)범위에서 각각 93.40±4.56%와 91.84±4.17%이었으며, 실험간변이(interassay variability)는 각각 6.02±5.33%와 6.75±2.68%이었고, 실험내변이(intra-assay variability)는 각각 4.89%와 4.54%로 우수하였다.

5. 돈육중에서 검출한계는 enrofloxacin과 ciprofloxacin 모두 0.03µg/g(0.15 ng)이었다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때 시료고체상분산처리법에 의한 돈육중 enrofloxacin과 ciprofloxacin의 전처리 및 HPLC/UV분석법은 기존의 방법을 대체할 수 있는 방법으로 사료되며, 전처리시간이 매우 짧고 조작이 간단하여 다수의 시료에서 신속하게 enrofloxacin과 ciprofloxacin을

분석하는 방법으로 편리하게 이용될 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Hooper DC, Wolfson JS. Quinolone antimicrobial agents, 2nd ed, David C and John S., Washington D. C., 1993.
2. Vance BK, Guay DR, Rotschafer JC. Clinical pharmacokinetics of ciprofloxacin. *Clin Pharmacokinect*, 19: 434-461, 1990.
3. Vancutsem PM, Babish JG, Schwark WS. The quinolone antimicrobials; Structure, antimicrobial activity, pharmacokinetics, clinical use in domestic animal and toxicity. *Cornell Vet*, 80: 173-186, 1990.
4. Zomer E, Charm SE. Chapter 19 ; Quinolone, reported by Charm science. 19-1~19-9.
5. Charriere R, Leiser W, Dousse R. Residue of veterinary drugs in food, Proceeding of the Euroresidue II, Conf. Veldhven, The Netherlands, 3-5 May. 241-245.
6. Bowser PR, Wooster GA, Leger J, et al. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout. *J Vet Pharmacol Ther*, 15: 62-71, 1992.
7. Anadon A, Martinez-Larranaga MR, Diaz MJ. Pharmacokinetics and residue of enrofloxacin in chicken. *Am J Vet Res*, 56: 501-506, 1993.
8. Horrie M, Saito K, Nose N, et al. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high performance liquid chromatography. *J Chromatography B Biomed Appl*, 653; 69-76, 1994.
9. Long AR, Hsieh LC, Barker SA. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of furazolidone in pork muscle tissue. *J AOAC*, 74: 292-294, 1991.
10. Schenck FJ, Barker SA, Long AR, et al. Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of nicarbazine in chicken tissue. *J AOAC*, 75: 659-662, 1992.
11. Kang HG, Son SW, Cho BH, et al. Multiresidue matrix solid phase dispersion extraction and HPLC de-

- termination of tetracyclines in animal muscle tissue. *Korean J of Veterinary Research*, 35;89, 1995.
12. Long AR, Crouch MD, Barker SA, *et al.* Multiresidue matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and gas chromatographic screening of chlorinated pesticide in catfish muscle tissue. *J AOAC*, 74: 667-670, 1991.
 13. Long AR, Hsieh LC, Barker SA, *et al.* MSPD isolation and liquid chromatographic determination of sulfadimethoxine in catfish muscle tissue. *J AOAC*, 73: 868-871, 1990.
 14. Jarboe HH, Kleinow KM. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of oxolonic acid in channel catfish muscle tissue. *J AOAC*, 75: 428-431, 1992.
 15. Long AR, Soliman, Barker SA, *et al.* Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and gas chromatographic screening of nine chlorinated pesticide in beef fat. *J AOAC*, 74: 493-496, 1991.
 16. Barker SA, Long AR. Preparation of milk sample for immunoassay and liquid chromatographic screening using MSPD. *J AOAC*, 77: 848-854, 1994.
 17. Long AR, Hsieh LC, Barker SA, *et al.* Isolation and gas chromatographic determination of chlorsulfan in milk. *J AOAC*, 72: 813-815, 1989.
 18. Long AR, Hsieh LC, Barker SA, *et al.* Multiresidue method for isolation and liquid chromatographic determination of seven benzimidazole anthelmintics in milk.. *J AOAC*, 72: 739-741, 1989.
 19. Long AR, Malbrough MS, Barker SA. Matrix solid phase dispersion isolation and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in fortified beef liver. *J AOAC*, 73: 860-867, 1990.
 20. Schenck FJ, Barker SA, Long AR, *et al.* Matrix solid phase dispersion(MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of ivermectin in bovine liver tissue. *J AOAC*, 75: 655-658, 1992.
-