

## HPLC-UV검출기를 이용한 논토양 중 oxolinic acid 분석

노석초 · 마상용<sup>1</sup> · 한성수\*

원광대학교 생명자원과학대학, 우석대학교 생명자원과학부<sup>1</sup>

**요약** : 논토양 중 quinolone계의 항균성물질인 oxolinic acid에 대하여 HPLC-UV검출기를 이용하여 정량하는 잔류분석방법을 설정하였다. 논토양 시료는 지역과 토성이 다른 2토양을 공시하였으며, 토양 중 oxolinic acid는 4 M-KOH : MeOH(1 : 3, v/v) 혼합용매로 추출하여 추출액을 산성화 한 다음 dichloromethane으로 액분배하여 dichloromethane층을 탈수, 농축 한 후 HPLC로 분석하였다. Oxolinic acid의 머무름 시간은 10.2 min이었으며, 검출파장은 262 nm였다. 표준검량선은 1~40 ng에서 결정계수( $r^2$ )가 0.999\*\*로 직선성을 보였으며, 직선회귀식은  $y=378.99x+135.08$ 이었다. 논토양 무처리시료에 oxolinic acid를 0.2 mg/kg과 1.0 mg/kg 수준으로 표준품을 첨가하여 회수율을 측정 한 결과 토양 1의 평균 회수율은 각각 90.9±4.52% (n=3)와 95.0±0.23% (n=3)였으며, 각각의 변이계수는 4.97%와 0.24%였다. 토양 2에서는 92.2±1.15% (n=3)와 93.1±0.31% (n=3)로 각각의 변이계수는 1.25%와 0.33%이었다. 검출한계는 두 토양 공히 0.05 ppm(50 ppb)이었다. (2005년 9월 6일 접수, 2005년 12월 20일 수리)

**Key words** : 고성능액체크로마토그래피, 논토양, 옥솔리닌산, 자외선 검출기, 잔류.

### 서 론

Oxolinic acid는 nalidixic acid의 유도체(Fierens 등, 2000)로 박테리아의 DNA-gyrase를 저해하여(Yorke와 Proc, 2000) 세포분열을 억제, 항균력을 발휘한다(Chen 등, 1996). 벼에 있어서 *Pseudomonas*와 *Erwinia* species를 포함하여 그람음성박테리아의 예방과 치료를 위해 1989년 일본 Sumitomo Chemical사에서 'Stamer'란 상품명으로 벼 종자처리제로 개발되었고(Tomlin, 1994), 국내에서는 원예용 살균제로써 일품<sup>®</sup>이라는 상표로 배추 무름병, 고추 반점세균병, 담배 줄기속마름병 등의 방제에 사용되고 있으며, 침투이행성 및 잔효성이 있다(농약공업협회, 2003). 국내 및 국외에서 양식어류용 항생제로 널리 사용(Lee 등, 1993)되고 있으며, 사람과 가축에게도 사용(Cohen 등, 1999; Touraki 등, 2001)되고 있을 뿐만 아니라 작물의 병해방제용 살균제로도 사용되고 있는 quinolone계의 강력한 항균성물질이다.

Oxolinic acid를 정량하기 위한 방법으로는 형광분석(fluorometry)법(Männistö, 1976), 생물학적검사(bioassay)법(Jeong 등, 1992; 보건사회부, 1994; Kim 등, 1998), CE(capillary electrophoresis)법(Saad 등, 2002), HPLC법(Díaz-cruz 등, 2003)이 보고되어 있으며, oxolinic acid

가 sodium tetrahydroborate와 함께 충분히 휘발성 유도체를 생성하는 것을 이용한 GC/MS에 의한 분석방법 또한 보고되어 있으나(Takatsuki, 1992) 널리 이용되지는 못하고 있다. 생물학적 검사법, 형광광도법은 HPLC법에 비하여 낮은 검출감도를 나타내며, 활성형 대사산물과 비특이적으로 반응하는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 1993). 특히 항생물질의 미생물 억제력을 이용하여 잔류량을 측정하는 생물학적 검사법의 경우 고가의 분석장비를 필요로 하지 않고 단순한 검사과정으로 이루어지나 여러 종류의 항생물질이 동시에 검출될 수 있으며, 어떤 종류의 항생물질이 잔류되었는지 알 수 없고 시료 중에 자연적으로 존재할 수 있는 효소나 지방 등이 시험군의 성장을 억제하거나 다른 계열의 항생제에 의해 비특이적으로 반응이 일어날 수 있는 단점 등이 있다(Song 등, 1994). CE법은 매우 제한된 영역에서 식품 중 잔류분석에 적용되어 왔고(Huang 등, 1997; Oka 등, 2000) 대부분의 분석방법이 역상 컬럼을 이용한 형광검출기와 자외선검출기에 의한 HPLC법에 의해 이루어지고 있다.

Oxolinic acid의 전처리는 시료를 추출, 정제 후 디아조메탄 발생장치를 이용, 디아조메탄으로 메틸화하여 분석하는 방법(한국식품공업협회, 2000), 추출 후 곧바로 HPLC에 주입하는 방법과 추출 후 액분배하여 주입하거나 solid phase extraction(SPE)에 의한 정제

\*연락처

Table 1. Physico-chemical properties of the soils used in this study

Classification	pH <sup>a)</sup>	O.M. (%)	CEC (me/100g)	Soil particle distribution (%)			Texture <sup>b)</sup>
				Sand	Silt	Clay	
Soil 1	5.6	1.8	20.4	84.5	6.1	9.4	clay
Soil 2	5.8	1.1	15.2	37.3	25.9	36.8	clay loam

<sup>a)</sup>Soil : H<sub>2</sub>O = 1 : 5 (w/w)

<sup>b)</sup>USDA Classification

Table 2. Exchangeable cations and inorganic material of two soils used in this study

Classi- fication	Ex. cations (cmol <sup>+</sup> /kg)			Inorganic material (mg/kg)				
	Ca	Mg	Fe	Cu	Zn	Mn	Ni	Co
Soil 1	0.49	0.82	310	5.2	6.3	78.2	<0.5	0.8
Soil 2	0.53	0.71	327	4.2	1.3	92.6	<0.5	1.0

후 주입하는 방법 등이 있으며(Loussouarn 등, 1997; Sorensen과 Hansen, 2001), HPLC에 의한 토양 중 oxolinic acid의 분석방법은 토양과 유사한 marine sediments의 분석에 대한 소수의 논문(Hansen 등, 1993; Pouliquen, 1994; Sorensen과 Hansen, 2001)과 Sumitomo Chemical사의 발토양 중 oxolinic acid의 형광검출기를 이용한 HPLC법(Sumitomo Co., 1990) 등이 제시되어 있으나 논토양 중 oxolinic acid의 자외선검출기를 이용한 HPLC법은 없는 실정으로 가장 널리 사용되고 있는 HPLC-UV검출기를 이용한 분석방법이 필요할 것으로 사료된다. 또한 최근 벼 세균성 벼알마름병 방제를 위한 종자처리제로 개발되고 있고, 이에 대한 토양 중 잔류성에 대한 자료가 요구되고 있기 때문에(농촌진흥청·농약공업협회, 2003), 살포된 농약의 최종집적지인 토양에서 잔류농약의 안전성 평가를 위한 적절한 분석방법이 필요하다.

본 연구에서는 Sumitomo Chemical사의 농약잔류분석 결과보고서(Sumitomo Co., 1991), 農藥殘留分析法 研究班(1995)의 방법 그리고 Touraki 등(2001)의 연구 논문 등을 변형, 논 토양 중 oxolinic acid의 HPLC-UV 검출기를 이용한 분석시 회수율을 향상시키고 효율적인 분석을 위한 최적조건을 설정하고자 추출 후 액액 분배에 의해 정제하여 분석하는 방법을 설정하였다.

## 재료 및 방법

### 공시토양

본 실험에 사용한 토양은 지역과 토성이 다른 전북 익산시 신룡동 원광대학교 시험포장의 토양 (토양 1)과 전북 군산시 성산면 산곡리 농가포장의 토양

(토양 2)을 공시하였다. 두 지역 토양의 이화학적 특성은 Table 1에 나타내었으며, 무기물 함량은 Table 2에 나타낸 바와 같다. 토양시료는 직경 5 cm 철제 core를 이용, 구당 10개 지점 이상에서 주상으로 시험구 전반에 걸쳐 토양 표층 10 cm 깊이로 토양과 물을 동시에 유리병에 채취한 후 2 mm 체를 통과시켜 굵은 모래, 자갈 및 식물체 뿌리 등을 제거한 다음 고루 혼합하고, 그 중 일정량을 취하여 분석시료로 하였다.

### 표준품 및 시약

Oxolinic acid 표준품(99.6%, 순도)은 주식회사 동방 아그로에서 분양받아 사용하였다. Methanol, water, dichloromethane은 HPLC급(Mallinkrodt, USA)을 사용하였으며, 완충액조제에 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(Shinyo, Japan)를 사용하였고 sodium hydroxide (Oriental Chem., Korea), sodium sulfate anhydrous(Shinyo, Japan), potassium hydroxide(Junsei, Japan) 및 hydrochloric acid(Duksan, Korea)는 분석용 특급시약을 사용하였다. 물은 2차 증류 후 영린기기의 AquaMax™Ultra를 통과시켜 탈이온화시킨 초순수를 이용하였다. 여과보조제로 Hyflo Super Cel(Fluka, Switzerland)을 사용하였다.

### 기기 및 장치

Oxolinic acid 분석에 이용된 HPLC는 Thermo Separation Products사(USA) 제품으로 Spectra UV 1000 UV-Vis detector, Spectra P2000 dual piston pump, Rheodyne 7125 valve injector(20 µL loop)로 구성되어 있으며, integrator는 D520B computing integrator (Younglin, Korea)를 사용하였다. 분석용 컬럼은 guard

column (4 × 3.0 mm I.D., particle size 5 μm, Phenomenex, USA)이 장착된 150 mm length × 4.6 mm I.D., particle size 5 μm Luna C18(2)컬럼 (00F-4252-E0, Phenomenex, USA)을 사용하였다. 용매는 Nylon 66 membrane filter(47 mm, 0.45 micron, Altech)를 사용하여 용매 여과장치(1 L, Altech, USA)로 여과 후 사용하였으며, 주입시료는 Nylon 66 membrane filter(13 mm, 0.45 micron)로 20 mL syringe type 여과장치(stainless steel syringe holder, Waters)를 이용하여 여과하였다. 항온진탕기는 DSK-511(Dae-il, Korea)이었으며, 회전 진공 증발장치는 Buchi R-114형 (Switzerland)을 사용하였다.

#### 표준검량선

Oxolinic acid 저장용액은 표준품(99.6%, 순도) 10.04 mg을 0.25 M-NaOH : MeOH(1 : 9, v/v) 100 mL에 용해시켜 0.1 mg/mL 농도로 조제한 후 3~4°C의 dark flask에 보관하였으며, 본 저장조건에서 3개월 동안 안정하였다. Working solution은 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0 μg/mL가 되도록 0.25 M-NaOH : MeOH(1 : 9, v/v)로 희석하여 분석 당일 조제하였으며, 20 μL씩을 HPLC에 주입하여 나타난 크로마토그램상의 peak height를 기준으로 검량선을 작성하였다.

#### 용매추출과 분배

농도양 시료 중 oxolinic acid를 추출하기 위하여 무처리 시료 20 g을 250 mL 삼각플라스크에 취한 후 4 M-KOH : MeOH(1 : 3, v/v) 30 mL을 가하여 40°C가 유지되는 항온진탕기 내에서 10분간 진탕시킨 다음 Hyflo Super Cel이 1 cm 두께로 깔려진 Büchner 깔때기 상에서 흡인여과하였다. 흡인여과 후 celite 상부의 토양잔사를 조심스럽게 다시 긁어 모아 삼각플라스크에 넣은 후 위 추출 및 여과 과정을 3회 반복 수행하여 모아진 전체 여과액을 1 L 분액여두에 옮기고 5% NaCl 200 mL와 4 M-HCl 200 mL을 차례로 가한 뒤 dichloromethane 150 mL을 가하여 5분간 진탕한 후 dichloromethane층을 분획, 무수황산나트륨이 채워진 깔때기를 통과시켜 탈수하였다. 수층에 다시 dichloromethane 150 mL를 가하여 5분간 진탕, 분배하고 앞의 무수황산나트륨이 채워진 깔때기로 통과시켜 탈수하였다. 새로이 수층에 dichloromethane 150 mL을 가하여 앞에 기술한 진탕, 분배 및 탈수 조작을 반복하여 얻어진 추출액을 감압농축장치를 사용하여 농축, 건조시킨 후 0.25 M-NaOH : MeOH(1 : 9, v/v) 20

mL에 용해하여 Nylon 66 membrane filter (13 mm, 0.45 micron)로 여과한 후 분석시료로 하였으며, 그 중 20 μL를 HPLC-UVD에 주입하였다.

#### 기기분석조건

이동상은 20 mM phosphate buffer, pH 2.1 : MeOH(55 : 45, v/v)로 Advantec HPLC solvent 여과장치(0.45 micron membrane filter)로 여과하여 사용하였다. 분석은 상온에서 진행하였고 등용매용리(isocratic) 조건이었으며, 검출파장은 262 nm, flow rate는 0.5 mL/min로 본 분석조건에서 oxolinic acid의 머무름시간은 10.2 min이었다. Guard column은 100-150회 주입시에 교체하였으며, 분석 전 2hr 이상 50 : 50(methanol : water, v/v)로 column conditioning을 실시하고 분석시 이동상으로 분석하였으며 분석 후 2시간 동안 reconditioning하였다.

#### 회수율

무처리 농도양시료 20 g에 각각 0.2 mg/kg, 1.0 mg/kg의 농도가 되도록 oxolinic acid 표준품(99.6%)의 4 ppm과 20 ppm 표준용액을 준비하여 각각 1 mL씩 첨가한 뒤, 균일하게 혼합하고 1시간동안 방치한 후 위 분석과정을 거쳐 회수율 시험을 행하였다.

#### 최소검출량 및 검출한계

최소검출량은 본 기기의 분석조건에서 표준품의 peak height가 signal to noise의 3배(S/N=3) 일 때로 하였고, 검출한계는 시료에 대하여 전체 분석조작을 실시하였을 때 oxolinic acid의 머무름시간에 그 유무가 명확히 판단될 수 있는 최저 한계농도로 하였으며, 최소검출량, 시료량, 주입전 시료용액의 양, 주입량으로부터 다음 일반공식에 의거하여 산출하였다.

$$\text{검출한계 (ppm)} = \frac{\text{최소검출량(ng)}}{\text{시료용액의 양(mL)}} \times \frac{\text{주입전 주입량(μL)}}{\text{시료량(g)}} \times 1$$

## 결과 및 고찰

#### 표준검량선

표준검량선 작성을 위해 위 제시한 기기분석조건으로 oxolinic acid 표준품을 0.25 M-NaOH : MeOH(1 : 9, v/v)에 용해시켜 농도별로 희석하여 HPLC에 주입 후 얻어진 크로마토그램의 peak height로 표준검량곡

선을 작성한 결과 검정곡선의 직선회귀식은  $y = 378.99x + 135.08$ 이었다. 또한 검량선 작성을 위한 농도범위(0.05  $\mu\text{g/mL}$ ~2  $\mu\text{g/mL}$ )에서 결정계수가 0.999\*\*로 직선성을 보여 peak height와 표준액 농도간에 높은 상관관계를 나타내었다. 토양시료 분석 전 얻어진 크로마토그램의 peak height를 기준으로 작성한 표준 검량선과 크로마토그램을 Fig. 1과 Fig. 2에 나타내었다.

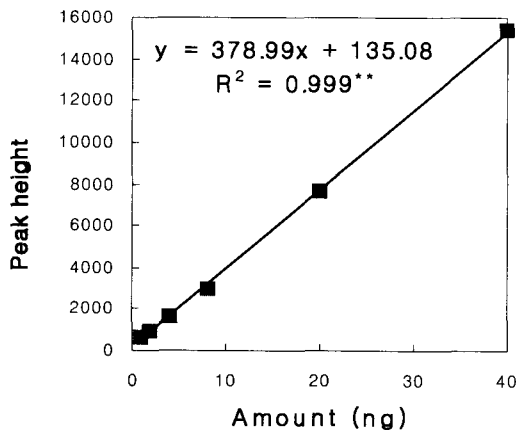


Fig. 1. Standard calibration curve of oxolinic acid.

#### 용매추출과 분배

본 시험의 전처리 과정에서 토양 중 oxolinic acid 추출조작은 반복간 변이를 줄이고 추출효율을 높이기 위해 40°C가 유지되는 항온진탕기 내에서 실시하였다. 대부분의 항생물질은 산성 완충액과 유기용매를 혼합하여 추출하도록 추천(Sören, 2003)되고 있는데, 그 예로 MeOH-12 M HCl; 쌀, 야채, 두류(農藥殘留分析研究班, 1995), McIlvaine buffer(pH 3.6)-MeOH; fish silage(Samuelsen, 1994), 0.013 M methanolic oxalic acid 용액, pH 1.4; shell(Pouliquen, 1997), 0.1 M phosphate buffer, pH 3; fish feed(Touraki 등, 2001), 0.1% metaphosphoric acid-methanol; fish tissue(Horie 등, 1987), 0.2% metaphosphoric acid in water/acetonitrile, pH 2.6; fish feeds(Pecorelli 등, 2003) 등 다양하게 보고되어 있다. 또한 fish feeds와 fish tissue에 대하여 10 mM phosphate buffer, pH 7(Saad 등, 2002)의 중성 추출용매도 보고되어 있으며, 분석 조건에 따라 dichloromethane; 식육(보건사회부, 1994), ethyl acetate; fish tissue (Lee 등, 1993), acetonitrile; chicken plasma(Hamamoto 등, 1986) 등의 유기용매 또한 사용되고 있다. 그러나 토양 또는 marine sediments에서는 추출용매로 0.1 M~0.2 M NaOH 등의 알칼리 용액이

사용되고 있어(Hansen 등, 1993; Pouliquen, 1994; Sorensen과 Hansen, 2001) 본 시료의 추출과정에서도 Sumitomo Co.(1991)의 방법에 따라 4 M-KOH : MeOH(1 : 3, v/v)로 추출하였으며, 30 mL 씩 4회 반복 추출하였을 때 추출 효율이 가장 높았다(Data 제시되지 않음). 이는 반복추출시 추출효율이 높았다는 Pouliquen(1994)의 연구보고와도 일치하는 결과이다.

Oxolinic acid는 중성 수용액에서 분자상태와 이온상태로 존재하게 되며 pK'a가 6.72이고 quinolone계 항생물질들의 2가 양이온과의 complex formation constant ( $\log K_f$ )가 1.1-4.6 영역에 분포(Park 등, 2000)함으로 액액분배시 Sumitomo Co.(1991)의 방법에 준하여 수층에 4 M-HCl 200 mL을 가하여 산성화 한 다음 oxolinic acid를 dichloromethane층으로 전용하였으며, dichloromethane 추출 횟수에 따른 회수율은 Table 3에 나타난 바와 같이 150 mL로 3회 액액분배 하였을 때 가장 높은 회수율을 나타내었다. 그러나 dichloromethane 150 mL 씩 3회 세정한 후 150 mL 씩 3회 추출하였을 때의 회수율은 3회 세정을 실시하지 않았을 때에 비하여 낮은 회수율을 보였으며, 세정을 실시한 경우와 실시하지 않은 경우의 크로마토그램에는 큰 차이가 없었다.

Table 3. Recovery of oxolinic acid by partitioning times with dichloromethane

Classification	Spiked (ppm)	Recovery by partition times (%)		
		once	twice	third
Soil 1	1.0	63.2±3.5	90.4±3.2	93.3±3.0
Soil 2	1.0	62.3±4.1	89.7±3.4	92.6±2.2

#### 회수율 및 검출한계

논토양 무처리시료 20 g에 검출한계의 4배와 20배인 0.2 ppm과 1.0 ppm의 농도가 되도록 oxolinic acid 표준용액을 각각 첨가하고 추출·정제과정을 3회 반복 수행하여 얻어진 크로마토그램을 분석하여 회수율과 검출한계를 구하였다. 분석법상의 최소 검출량과 검출한계는 각각 1.0 ng과 0.05 mg/kg 이었으며, 그 결과를 Table 4에 나타내었으며, 논토양 중 oxolinic acid의 무처리시료 분석 크로마토그램과 회수율시험 크로마토그램을 Fig. 2에 나타내었다. 두 지역 논 토양에 대한 평균 회수율은 0.2 mg/kg과 1.0 mg/kg 처리시 토양 1에서 각각 90.9±4.52% (n=3)와 95.0±0.23% (n=3)였으며, 각각의 변이계수는 4.97%와 0.24%였다.

Table 4. Recovery of oxolinic acid

Classification	Spiked (ppm)	Recovery (%)					Limit of detection (ppm)	Minimum detectable amount(ng)
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Mean±SD	C.V. <sup>a)</sup>		
Soil 1	0.2	94.5	92.3	85.8	90.9±4.52	4.97	0.05 <sup>b)</sup>	1.0
	1.0	95.1	94.7	95.1	95.0±0.23	0.24		
Soil 2	0.2	91.3	93.5	91.8	92.2±1.15	1.25		
	1.0	93.4	92.8	93.0	93.1±0.31	0.33		

<sup>a)</sup> SD/Mean of recovery×100

<sup>b)</sup>  $1\text{ ng} \times \frac{20\text{ mL}}{20\text{ }\mu\text{L}} \times \frac{1}{20\text{ g}} = 0.05\text{ ppm}$

토양 2에서는 92.2±1.15% (n=3)와 93.1±0.31% (n=3)였고, 각각의 변이계수가 1.25%와 0.33%로 첨가농도와 토양간에 큰 차이 없이 안정되고 높은 회수율을 나타내었다. 이는 Sumitomo Co.(1990)에서 수행한 형광 검출기를 이용한 HPLC분석법에서의 회수율 78~88%과 비교하여 향상된 회수율이며, Yang 등(1995)이 수행한 분석에서의 회수율인 89.3%~93.8%와 비등한 결과이다. 시료분석시 oxolinic acid의 머무름시간에서 방해물질 peak가 있기는 하였지만 정량에는 어려움이 없었다. Pouliquen 등(1994)은 marine sediments 중 oxolinic acid의 회수율 실험에서 67.8~68.9% 범위의 낮은 회수율을 보였는데, 그 원인을 Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 등의 2가 양이온이 oxolinic acid와 착물(complexes)을 형성하여 추출에 어려움(pouliquen 등, 1992) 있는 것으로 설명하고 있으나, 본 실험에서 90%이상의 회수율을 얻은 것으로 볼 때 본 실험조건에서 2가 양이온의 영향은 크지 않은 것으로 판단된다. 또한 Sorensen 등(2001)의 결과와 같이 유기물함량 또한 회수율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료되며, 다만 유기물함량이 다른 두 토양에서의 크로마토그램은 유기물함량이 많은 토양 1에서 더 많은 불순물 peak가 출현하였다.

기기분석조건

Quinolone계 유도체는 HPLC에 의한 분석시 역상컬럼 이동상의 pH에 따라 분리도 및 감도에 영향을 받으며(Barosa 등), 대부분 pH 3 이하의 낮은 pH에서 분석을 수행하였다. 본 실험의 경우에도 이동상의 pH가 낮았을 때 peak이 잘 분리됨을 알 수 있었으며, 감도도 낮은 농도까지 검출할 수 있었다. 검출파장은 분석조건 및 이동상 조성에 따라서 254 nm (Touraki 등, 2001), 260 nm(Hamamoto, 1986), 262 nm(Pouliquen 등, 1994) 280 nm(Horie 등, 1987), 340 nm(Loussouam 등, 1997) 등의 파장에서 분석하였으며, 본 분석조건

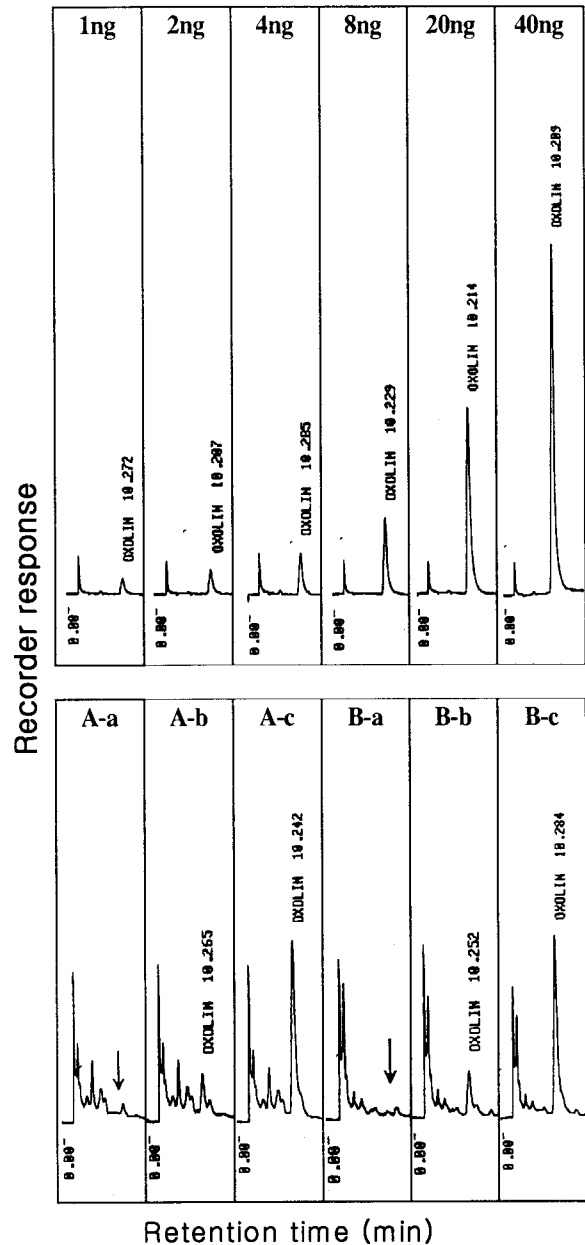


Fig. 2. HPLC chromatograms of oxolinic acid standard(upper), control and spiked soil sample(lower). A: soil 1, B: soil 2; a: control, b: recovery 0.2 ppm, c: recovery 1.0 ppm.

에서는 20 mM phosphate buffer, pH 2.1 : MeOH(55 : 45, v/v) 혼합용매 사용시 262 nm에서 최대 흡광도를 보여 본 과정에서 분석하였다. 또한 주입액인 NaOH : MeOH(1 : 9, v/v) 혼합용매 중 NaOH 농도에 따른 oxolinic acid의 감도는 NaOH 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 0.25 M-NaOH : MeOH(1 : 9, v/v) 혼합용매를 주입하였을 때 최대의 peak height를 나타내었다. 특히 최종 정용액을 phosphate buffer로 하였을 경우 시료가 진한 갈색으로 변하여 분석에 어려움이 있었으며, 이동상으로 정용하였을 때에는 시료가 완전히 용해되지 않았다.

본 분석법은 검출한계, 회수율, 분석오차 면에서 농촌진흥청 · 농약공업협회(2003)의 농약잔류분석시험 기준과 방법에 부합할 뿐만 아니라, 용이한 분석과정과 재현성 등으로 토양 중 oxolinic acid의 실용적 분석법으로 활용 가능하리라 판단되며, 앞으로 토양 이외의 분석대상에 대해서도 적용가능한지 여부에 대하여 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 논문은 2005년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다

## 인용문헌

- Barosa, J., R. Berges and V. Sanz-Nebot (1998) Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography effect of pH and evaluation of ionization constant. *J. Chromatogr. A.* 823:411~422.
- Chen, C. R., M. Malik, M. Snyder and K. Drlica (1996) DNA Gyrase and Topoisomerase IV on the bacterial chromosome: quinolone-induced DNA cleavage. *J. Mol. Biol.* 258:627~637.
- Cohen, E., R. J. Maxwell and D. J. Donoghue (1999) Automated multi-residue isolation of fluoroquinolone antimicrobials from fortified and incurred chicken liver using on-line microdialysis and high-performance liquid chromatography with programmable fluorescence detection. *J. Chromatogr. B.* 724:137~145.
- Díaz-cruz, M. S., M. J. López de Alda and D. Barceló (2003) Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *Trends in Anal. Chem.* 22(6):340~351.
- Fierens, C., S. Hillaert and W. Van den Bossche (2000) The qualitative and quantitative determination of quinolones of first and second generation by capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22:763~772.
- Hamamoto, K. (1986) Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in chicken plasma. *J. Chromatogr.* 381:453~456.
- Hansen, P. K., B. T. Lunestad and O. B. Samuelsen (1993) Effects of oxytetracycline, oxolinic acid, and flumequine on bacteria in an artificial marine fish farm sediment. *Can. J. Microbiol.* 39:1307~1312.
- Horie, M., K. Saito, Y. Hoshino and N. Nose (1987) Simultaneous determination of nalidixic acid, oxolinic acid and piromidic acid in fish by high performance liquid chromatography with fluorescence and UV detection. *J. Chromatogr. A.* 402:301~308.
- Huang, T. S., W. X. Du, M. R. Marshall and C. I. Wei (1997) Determination of oxytetracycline in raw and cooked channel catfish by capillary electrophoresis. *J. Agri. Food Chem.* 45:2602~2605.
- Jeong, H. D., J. Y. Ha, M. D. Huh and J. K. Chung (1992) The absorption and excretion times of carp, *Cyprinus carpio*, treatment with oxolinic acid. *J. Fish Pathol.* 5(2):135~142.
- Kim, M. S., S. W. Park, M. D. Huh and H. D. Jeong (1998) Effect of temperature and bacterial infection on the absorption and elimination of oxolinic acid in Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*). *J. Korean Fish Soc.* 31(5):677~684.
- Lee, M. H., J. Y. Lim, S. K. Jung, S. W. Son and J. W. Park (1993) Determination of oxolinic acid residues in *Acetes japonicus* by HPLC. *Kor. J. Food Hygiene.* 8(3):147~150.
- Loussouarn, S., H. Pouliquen. and F. Armand (1997) High performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid in the plasma of seabass (*Dicentrarchus labrax*) anaesthetized with 2-phenoxyethanol. *J. Chromatogr. B.* 698:251~259.
- Männistö, P. T. (1976) Pharmacokinetics of nalidixic acid and oxolinic acid in healthy women. *Clin. Pharmacol. Ther.* 19(1):37~46.
- 農藥殘留分析研究班 (1995) 最新農藥の殘留分析法.

- pp.461~462, 中央法規出版, 日本.
- Oka, H., Y. Ito and H. Matsumoto (2000) Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J. Chromatogr. A.* 882:109~133.
- Park, H. R., K. Y. Chung, H. C. Lee, J. K. Lee and K. M. Bark (2000) Ionization and divalent cation complexation of quinolone antibiotics in aqueous solution. *Bull. Korean Chem. Soc.* 21(9):849~854.
- Pecorelli, I., R. Galarini, R. Bini, A. Floridi, E. Casciarri and A. Floridi (2003) Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography, *Anal. Chem. Acta.* 483:81~89.
- Pouliquen, H., D. Gouelo, M. Larhantec, N. Pilet and L. Pinault (1997) Rapid and simple determination of oxolinic acid and oxytetracycline in the shell of the blue mussel (*Mytilus edulis*) by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.* 702:157~162.
- Pouliquen, H., D. Keita and L. Pinault (1992) Determination of oxytetracycline in marine shellfish (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes philippinarum* and *Scrobicularia plana*) by high-performance liquid chromatography using solid phase extraction. *J. Chromatogr. A.* 627:287~293.
- Pouliquen, H., L. Pinault and H. Le Bris (1994) Determination of oxolinic acid in seawater, marine sediment, and Japanese oyster (*Crassostrea gigas*) by high performance liquid chromatography. *J. Liq. Chromatogr.* 17(4):929~945.
- Saad, B., R. Mohamad, N. Mohamad, G. D. Lawrence, M. S. Jab and M. I. Saleh (2002) Determination of oxolinic acid in feeds and cultured fish using capillary electrophoresis. *Food Chem.* 78:383~388.
- Samuelson, O. B. (1994) High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid residues in fish silage. *J. Chromatogr. B.* 655(2):311~314.
- Song, S. O., M. H. Cho, K. S. Shin, M. H. Lee, P. D. Ryu, B. G. Jeong, S. W. Lee and H. G. Lee (1994) Simultaneous determination of residual tetracyclines in beef, pork and chicken meats by high performance liquid chromatography. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* 18(4):343~352.
- Sören, T. B. (2003) Pharmaceutical antibiotic compounds in soils-a review, *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 166:145~167.
- Sorensen, L. K. and H. Hansen (2001) Determination of oxolinic acid in marine sediment by HPLC with fluorescence detection. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* 24(16):2469~2476.
- Sumitomo Co. (1991) Residue data of S-0208 in soil. Japan.
- Takatsuki, K. (1992) Gas chromatographic/mass spectrometric determination of oxolinic acid, nalidixic, and promidic acid in fish. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists International.* 75:982~987.
- Tomlin, C., Ed. (1994) The pesticide manual 10th edition. pp.760, The British Crop Protection Council.
- Touraki, M., M. Ladoukakis and C. Prokopiou (2001) High-performance liquid chromatographic determination of oxolinic acid and flumequine in the live fish feed *Artemia*. *J. Chromatogr. B.* 751:247~256.
- Yang, J. E., D. S. Park and D. S. Han (1995) Comparative assessment of half-lives of benfuresate and oxolinic acid estimated from kinetic models under field soil conditions. *Korean J. Environ. Agric.* 14(3):302~311.
- Yorke, J. C. and P. Froc (2000) Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 882:63~77.
- 농약공업협회 (2003) 농약사용지침서. pp.162.
- 농촌진흥청·농약공업협회 (2003) 농약등록시험담당자 교육교재. pp.173~200.
- 보건사회부 (1994) 식품공전. pp.27~28.
- 한국식품공업협회 (2000) 식품공전. pp.899~901.

---

**Determination of Oxolinic Acid in Paddy Soil by HPLC Coupled with UV Detector**

Seog-Cho Lo, Sang-Yong Ma<sup>1</sup>, Seong-Soo Han\*(*College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea, <sup>1</sup>Division of Life Resource Science, Woosuk University, Wanju 565-701, Korea*)

**Abstract** : This study was performed to examine analytical method of a quinolone compound, oxolinic acid in paddy soil by HPLC coupled with UV detector. Two types of soil texture in different regions were used for this experiment. Oxolinic acid was extracted by a 4 M-KOH : MeOH(1 : 3, v/v) mixtures and acidified followed by liquid-liquid partitioning in dichloromethane. Dichloromethane layer was dehydrated, evaporated and analyzed by HPLC (262 nm). Retention time was 10.2 min. The standard calibration curve of oxolinic acid showed linearity ( $r^2 > 0.999^{**}$ ,  $y = 378.99x + 135.08$ ) in the range of 1~40 ng. The mean recoveries, evaluated from fortified soil samples at two concentration levels of 0.2 mg/kg and 1.0 mg/kg, were  $90.9 \pm 4.52\%$  (C.V. 4.97%) and  $95.0 \pm 0.23\%$  (C.V. 0.24%) for soil 1 and  $92.2 \pm 1.15\%$  (C.V. 1.25%) and  $93.1 \pm 0.31\%$  (C.V. 0.33%) for soil 2, respectively. The detection limits of two types of soils were same as 0.05 ppm. Overall, the present analytical method of oxolinic acid by HPLC coupled with UV detector seems to be used reasonably.

Key words : oxolinic acid, HPLC, UV detector, residue, paddy soil

---

\*Corresponding author (Fax : +82-63-850-6678, E-mail : seshan@wonkwang.ac.kr)