

## HPLC를 이용한 어류 종의 Oxolinic Acid 분석

이희정\* · 이태식 · 손광태 · 김풍호 · 조미라 · 박미정<sup>1</sup> · 이영호<sup>2</sup>  
국립수산과학원, <sup>1</sup>국립수산물품질검사원, <sup>2</sup>대한민국 국회

### Analysis of Oxolinic Acid in Fish Products Using HPLC

Hee Jung LEE\*, Tae Seek LEE, Kwang Tae SON, Poong Ho KIM,  
Mi Ra JO, Mi Jung PARK<sup>1</sup>, Young Ho YI<sup>2</sup>

National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-092, Korea

<sup>1</sup>National Fishery Products Quality Inspection Service, Gyunggi-do 410-315, Korea

<sup>2</sup>The National Assembly of the Republic of Korea, Seoul 150-701, Korea

A high-performance liquid chromatography assay method for oxolinic acid in fish products was developed, evaluated and validated through the monitoring of oxolinic acid based on farming and distribution. The recovery rate of the developed method was 102.3-106.7% as compared to conventional methods. The stock solution was stable for 3 weeks under refrigerated condition at 4°C. The performance limit was evaluated as 0.01ppm of oxolinic acid in fish muscle. 478 fish samples such as olive flounder, genuine porgy, common sea bass and black rock fish collected from fish farms in the coastal area from September 2001 to October 2004 were analyzed to evaluate overall efficiency of the modified method and to monitor the actual condition of oxolinic acid usage in fish farm. According to the monitoring results, the modified method was suitable for analysis of oxolinic acid in fish muscle and oxolinic acid might be used in a small portion of fish farms. The suggested analysis method of oxolinic acid was registered in the Korean Official Methods of Food Analysis and is being utilized for fishery products by the Korea Food and Drug Administration and the National Fisheries Products Quality Inspection Service.

Key words: HPLC, Oxolinic acid

#### 서 론

옥소린산(Oxolinic acid)은 수산양식에서의 질병 예방이나 치료를 목적으로 다양하게 사용되고 있다(Kim et al., 1998). 특히 어류 장관에서의 흡수 시 장관내에 존재하는 사료 분해 산물에 의하여 영향을 받지 않으며, 병원성 세균을 신속하게 사멸시킬 뿐만 아니라 다른 항균제와의 간섭작용을 나타내지 않기 때문에 (Inglis and Richards, 1991) 어류의 세균질병 복합 감염증에 탁월한 효과를 나타내는 것으로 보고되고 있다. 특히 옥소린산은 백장어 양식에서 *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Edwardsiella*, *Flexibacter* 및 *Pasteurella* 속의 균들이 유발하는 각종 어병에 유효하며, 일반적으로 5-20 mg/kg의 용량으로 사료에 섞어서 5-7일간 연속 경구투여하는 방식으로 사용되고 있다(Chun, 1992). 약 20종 이상의 옥소린산 제제가 국내에서 판매되는 것으로 파악되고 있다(KAHPA, 2001).

옥소린산은 nalidixic acid의 유도체로 박테리아의 DNA 복제 기능을 저해하여 세포분열을 억제함으로써 살균효과를 나타내고, 기타 항생물질과 설파제 등에 내성이 생긴 세균에 대하여도 우수한 항균력을 발휘하며 자체 내성은 물론이고 이들과의 교차내성도 없는 항생제로 알려져 있다(Jeong and Chun, 1992). 뿐만 아니라 옥소린산은 생체 내에서의 배출속도가 기존의 항생제 보다 빠른 것으로 보고되고 있다(Jacobsen

1989; Hustvedt et al., 1991). 이와 같이 옥소린산은 기존의 항생제에 비하여 많은 장점이 있어, 수산양식에 널리 사용되고 있다.

1980년대 이후 우리나라에서 산업적 규모의 수산양식에 본격적으로 도입된 이후 여러 가지 요인에 의하여 발생하는 어류질병 예방이나 치료를 위하여 사용되는 각종 항생제에 대한 식품위생학적 안전 확보의 필요성이 제기됨에 따라, 양식어류를 비롯한 식품 중에 존재하는 각종 항생제의 확인·평가하는 수산식품위생관리 정책 수립 및 이행의 필수 요건으로 부각되고 있다.

본 연구자들은 그 동안 수산식품 중에 존재하는 각종 항생제 분석법 개발에 관한 연구를 수행하고 tetracycline계 항생제와 같은 일부 항생제에 대하여는 기존의 항생제 분석법을 대체할 만한 효과적인 분석법을 개발하기도 하였다. 그러나 기존의 식품 중의 옥소린산 분석법(Kasuga et al., 1982; Hamamoto, 1986; Nose et al., 1987; Horii et al., 1987)은 검출한계가 낮고, 시료처리법이 복잡하여, 어류 중에 잔류하는 옥소린산을 정확하고 신속하게 검출하는데 효율적으로 사용하기 곤란한 문제점이 제기되고 있다.

따라서 본 연구에서는 옥소린산에 대한 수산식품 위생안전 확보 차원에서 양식 어류 중에 존재하는 옥소린산을 고감도로 신속하게 검출할 수 있는 시험법을 개발하였으며, 시험법의 현장 적용성을 확인하기 위하여 양식중인 어류 및 시중

\*Corresponding author: hjlee@nfrdi.re.kr

유통 중인 어류를 대상으로 옥소린산 잔류 정도를 모니터링 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 시료

본 연구에서 사용된 항생제의 표준품은 옥소린산(Sigma, St. Louis, Mo, USA)을 사용하였으며, 시료 중의 항생제 추출에는 dichloromethane, acetonitrile, methanol, oxalic acid 등을 사용하였다.

양식어류 중의 옥소린산 잔류 모니터링은 부산, 통영 거제, 완도, 장흥, 여수 및 제주지역 양식장에서 양식중인 어류를 대상으로 하였다.

### 항생제 표준용액 조제 및 표준곡선 작성

**Stock solution:** 옥소린산 표준품 10 mg을 100 mL 용량플라스크에 취하고, methanol 10 mL와 1 N NaOH 2 mL를 가하여 잘 녹인 다음 물로 정용하여 100 ppm 농도의 표준용액(Stock solution)을 조제하였다.

**Working solution:** Stock solution 10 mL를 취하여 100 mL 용량플라스크에 옮기고 옥소린산 분석에 사용되는 HPLC 이동상으로 정용하여 10 ppm 농도의 표준용액을 조제하고, 이 표준용액을 희석하여 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ppm의 working solution을 조제하였다.

**HPLC 이동상의 제조:** 0.01 M oxalic acid, acetonitrile, methanol을 6:3:1의 비율로 혼합한 후 여과(0.2  $\mu$ m, Nylon, Millipore, USA)하여 이동상으로 사용하였다.

### 옥소린산의 추출 및 분석

어류 중의 옥소린산 추출 및 분석은 일본 고베검역소(KQS, 1996), 우리나라 국립수산물검사소 및 식품의약품안전청(KFDA, 2002)에서 제시한 방법을 다음과 같이 개량하여 실시하였다.

어류의 껍질을 벗긴 후 필렛을 뜯 어육을 잘게 마쇄한 다음, 어육 10 g을 취하여 dichloromethane 40 mL를 첨가하여, homogenizer (Polytron PT 3000, Switzerland)로 2분간 균질화시켜 옥소린산을 추출하였다(Fig. 1). 추출액은 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 dichloromethane층(하층)만을 취하여 농축수기로 옮기고, 추출잔사는 같은 용매를 사용하여 재추출하였다. 2회 추출한 액은 합쳐서 감압농축기(Eyela Co., Japan)를 사용하여 35°C에서 1 mL로 농축시켰다. 농축액에 0.1 N HCl 40 mL를 가하여 추출액을 산성화시킨 후, 분액여두에 옮기고, n-hexane (40 mL)으로 2회 세척하여 지질을 제거하였다. 지질을 제거한 추출액은 dichloromethane 40 mL씩 2회 반복추출한 다음 dichloromethane층을 35°C에서 감압농축으로 완전히 건조시켰다. 그리고 HPLC에서 옥소린산 분석 시 사용하는 이동상(0.01 M Oxalic acid: Acetonitrile: Methanol; 6:3:1) 2 mL로 용해시킨 후 0.2  $\mu$ m membrane filter (Millipore, USA)로 여과한 후 HPLC로 분석하였다. 옥소린산 표준품 및

시료 추출액의 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC instruments and analysis conditions for oxolinic acid

HPLC	Shiseido nanospace SI-2 system
Column	Cosmosil 5C <sub>18</sub> -AR, 4.6 mm ID×150 mm
Mobile phase	Methanol:Acetonitrile:0.01 M Oxalic acid = 1:3:6
Flow rate	1 mL/min
Detector	Ex 328 nm, Em 370 nm (Spetra-Physics FL 3000)
Injection volume	20 $\mu$ L
Ending time	10 min

항생제 표준품 및 추출액의 분석에는 Cosmosil 5C<sub>18</sub>-AR 역상 column (4.6 mm ID×150 mm, Nacalai Tesque, Inc., Japan) 이 장착된 Shiseido nanospace SI-2 HPLC system (Shiseido Co., Japan)과 Spetra-Physics FL 3000 형광검출기(Spectra-Physics Inc., Germany)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 옥소린산 분석을 위한 기존방법의 문제점 및 개선

옥소린산은 국내외에서 어류 양식과정에 발생하는 질병 치료나 예방을 목적으로 다양하게 사용되고 있다(Kim et al., 1998). 그리고 기타 항생제와 같이 식품 중에 잔류할 경우 항생제 내성균 유발이나 인체에 직접적인 독성을 나타내는 경우가 있어, 세계 각국에서는 양식어류를 비롯한 각종 식품에서의 허용기준치를 설정하고 있다. 그러나 식품 중에 존재하는 옥소린산의 검출에 대한 기존의 분석법은 검출감도가 낮고, 시료처리법이 복잡하여 양식어류를 비롯한 식품 중에 존재하는 옥소린산을 고감도로 신속하게 분석하기 곤란한 문제점이 있는 것으로 파악되고 있다.

즉 우리나라에서는 1997년부터 국립수산물품질검사원에서 대일 수출용 활뱀장어에 대하여 일본의 수입검사 강화에 대응하기 위하여 일본 후생성 등에서 사용하고 있던 시험법을 사용하여 옥소린산 분석을 실시하였다. 이 분석방법에서는 dichloromethane으로 옥소린산을 추출한 후 0.1 M HCl로 정제하고 형광검출기가 장착된 HPLC로 분석하였으나 HPLC 이동상의 조성 및 분석과장의 선택이 적절하지 못하여 검출감도가 상당히 낮은 문제점이 있는 것으로 파악되었다.

한편, 우리나라 식품공전에 축육에서 옥소린산을 검출하기 위하여 2002년 이전에는 시료 전처리과정에 디아조메탄을 사용하여 메틸화시킨 옥소린산을 자외선검출기 254 nm에서 분석하였으나 이 시험법은 시료 처리가 상당히 복잡하여 다량의 시료를 신속히 처리하는데 상당한 문제점이 있는 것으로 확인되었다. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 2002년에 개정된 축육에 대한 옥소린산 검출시험법에서는 건식추출법(Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD)을 채택하였다. 그러나 이 시험법에서는 시료 채취량을 2 g으로 정하고 있기 때문에 분석 결과치의 대표성에 이론의 여지가 있을 수 있다는 것이

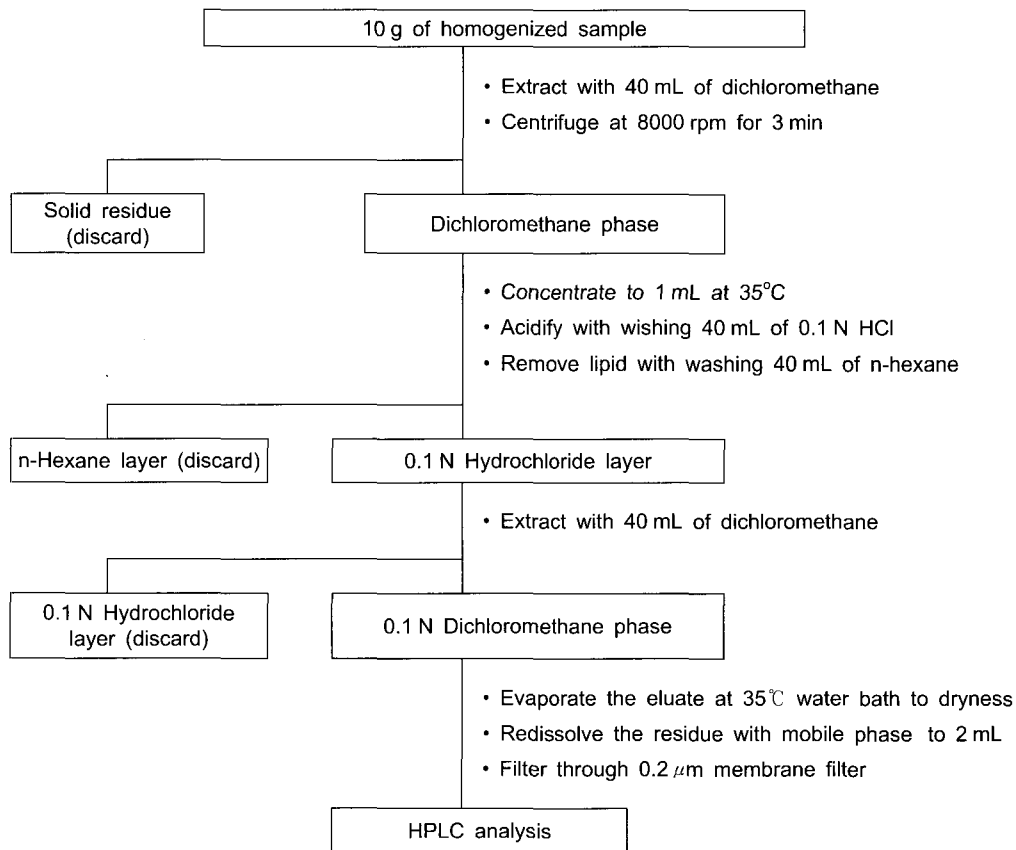


Fig. 1. Summary of clean-up procedure of oxolinic acid for fish sample.

단점으로 지적되고 있다.

따라서 본 연구에서는 기존의 옥소린산 분석법을 비교분석하여 식품 중에 존재하는 옥소린산을 고감도로 신속히 분석할 수 있는 시험법을 확립하였다.

즉 국립수산물품질검사원에서 활백장어의 옥소린산을 검출하였던 HPLC 분석조건을 검토한 결과 옥소린산 분석 파장 Ex 338, Em 366의 조건에서는 0.1 ppm의 옥소린산 표준용액은 검출할 수 없었으며, 0.5 ppm 표준용액도 거의 trace 정도의 peak만을 나타내어 분석 감도가 매우 낮은 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 분석파장을 Ex 328, Em 370 nm의 조건으로 수정할 경우 옥소린산 표준용액의 경우 0.1 ppm까지 분석이 가능하여 분석감도가 약 4배 정도 증가하는 것을 확인하였다.

한편 수산물품질검사원에서 사용한 시험법에서의 이동상 (acetonitrile:methanol:0.1 M citric acid=1:3:6) 중 0.1 M citric acid를 0.01 M oxalic acid로 대체할 경우 크로마토그램상의 옥소린산 peak의 sharpness가 좋아지는 것으로 확인되어 이동상 또한 수정하였다(Fig. 2).

#### 표준 검량선

각 농도의 옥소린산 표준용액(0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 ppm)을 20 μL씩 취하여 3회 반복 분석한 크로마토그램으로부터 농도

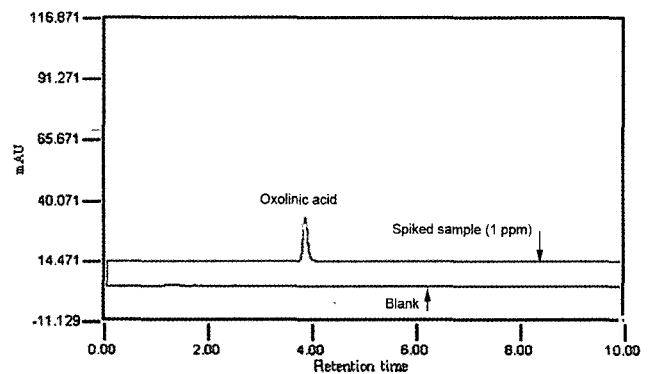


Fig. 2. HPLC chromatogram of oxolinic acid in spiked olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) sample.

별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다(Fig. 3).

시험용액 분석에서 얻은 크로마토그램으로부터 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 피크에 대한 평균면적을 구한 다음 검량선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 검량선상 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점이 시험용액의 농도를 나타내었다. 이 농도에 시험용액의 희석배수(잔류물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누

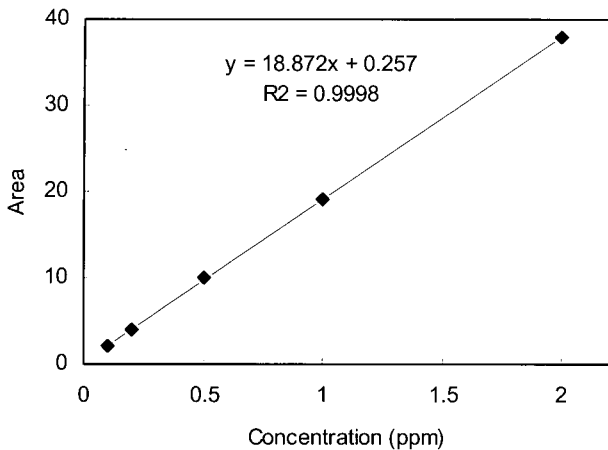


Fig. 3. Standard calibration curve for determination of oxolinic acid.

이 최종 시료 중 각 성분의 농도를 산출하였다.

시료 중 항균제의 농도 =

$$\frac{\text{시료의 피크면적}}{\text{표준용액 피크면적}} \times \frac{\text{표준용액농도}}{\text{시료무게}}$$

표준검량선은 0.1-2.0 ppm에서 결정계수( $r^2$ )가 0.9998로 직선성을 보였으며, 직선회귀식은  $y = 18.872x + 0.257$ 이었다.

회수율

옥소린산 표준용액 (0.5, 1.0 ppm)을 첨가한 시료를 dichloromethane으로 추출한 후 일반 시료 전처리와 같은 방법으로 시료를 처리하여 HPLC로 분석하였다. 분석한 결과를 표준용액의 농도 peak와 비교하여 회수율을 측정하였다. 어류 시료에 옥소린산을 0.5 ppm과 1.0 ppm 첨가하여 회수율을 측정한 결과 평균회수율은 102.3±3.77% (n=3) 및 106.7±2.02% (n=3)이었으며, 각각의 변이계수는 3.68%와 1.84%로 높은 회수율을 나타내었다(Table 2). 한편, Pouliquen and Armand (2000)는 HPLC를 이용해서 가자미류에 옥소린산을 경구 투여한 후에 분변 및 오줌에서 옥소린산을 검출하는 시험을 실시한 결과 분변의 회수율이 102.0±12.5%를 나타내었고, Ueno et al. (1988)은 335 nm의 자외선 검출기로 옥소린산을 분석하였을 때 무지개송어의 근육에서는 77.3%, 연어(*Amago salmon*)는 79.1%의 회수율을 얻었다고 보고하였다. 그리고 Nose et al. (1987)은 뱀장어에서 75.4-85.4%, 무지개송어에서는 81.9-90.5%의 회수율을 보고한 바 있으며, Ikai et al. (1989)은 여러

Table 2. Recovery of oxolinic acid from oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*) muscle tissue

Times	Recovery rate (%)	
	0.5 ppm	1.0 ppm
1st	107.6	104.1
2nd	99.1	107.2
3rd	100.2	109.0
Average	102.3	106.7
CV	3.68	1.84

물고기에서 77.1-95.5%, Larocque et al. (1991)은 연어에서 71-83%의 회수율을 각각 보고한 바 있다.

옥소린산 분석을 위한 표준용액의 안정성

Stock solution

옥소린산 분석에서의 표준품으로 사용하는 stock solution의 안전성을 확인하기 위하여 옥소린산을 methanol과 1 N NaOH를 가하여 녹인 다음 증류수로 100 ppm 농도액을 조제하고 이것을 실온과 냉장에 보관하면서 저장중의 안전성을 조사하였다. 옥소린산의 표준용액(100 ppm)은 실온과 냉장(4°C) 조건하에서 저장 3주까지 안정성을 유지하는 것을 확인하였다(Table 3). 표준용액의 안전성은 표준용액을 각각 1.0 및 0.5 ppm으로 희석한 용액으로 측정하였다.

Working solution

또한 옥소린산 표준용액(100 ppm)으로 조제한 working solution (0.1-5 ppm)의 실온 및 냉장 조건하에서의 안전성을 확인한 결과, working solution의 경우 4°C에 저장할 경우 1일 경과 후에도 거의 100%를 유지하였으나, 실온에 보관하는 경우 1일 경과 후 농도에 따라서 96%까지 떨어지는 것이 확인되었다(Table 4).

이상의 결과 표준용액(100 ppm)의 경우 조제 후 상당한 기간까지 안정성이 유지되었으나, working solution의 경우는 안정성 보장이 거의 불가능하기 때문에 시험당일 조제하여 사용하여야 하는 것으로 확인되었다.

어류양식장을 대상으로 한 항생제 사용실태 모니터링

본 연구에서 개발된 분석방법의 활용 가능성 확인 및 어류 양식장에서의 옥소린산 사용실태 파악을 위하여, 2001년부터 2004년까지 남해안 일원에서 운용 중인 넙치, 참돔, 농어, 조피볼락 양식장의 양식어류 및 시중에 유통 중인 활발양어에서의 옥소린산 잔류 여부 확인을 위한 모니터링을 실시하였다.

넙치양식장의 경우, 2001년도에는 경남 통영, 전남 장흥

Table 3. Stability of standard oxolinic acid solution under room temperature and refrigeration at 4°C

Storage condition	Standard solution (ppm)	Storage				Number of samples
		1st week	2nd week	3rd week	4th week	
Room temperature	0.5	107.4±0.3	104.8±0.4	106.0±0.8	95.8±0.5	3
	1.0	107.8±0.2	101.1±0.3	104.3±0.6	94.3±0.4	3
Refrigeration (4°C)	0.5	106.2±0.4	106.8±0.4	108.1±0.6	96.5±0.3	3
	1.0	108.5±0.1	103.6±0.2	105.5±0.4	97.1±0.2	3

Table 4. Stability of working oxolinic acid solution during storage time

Standard solution (ppm)	Storage days						Number of samples
	1st day	3rd day	5th day	1st week	2nd week	3rd week	
Room temperature							
0.1	96.5±1.0	89.3±2.4	83.2±0.9	86.8±0.5	87.8±2.3	74.1±1.8	3
0.2	96.3±0.6	90.0±1.2	87.0±1.5	87.0±0.8	87.4±2.6	81.8±1.3	3
0.5	100.2±0.5	95.7±0.8	92.9±0.8	92.8±1.1	93.7±1.3	87.8±0.8	3
1.0	100.5±0.6	95.8±1.0	94.6±0.6	94.1±0.9	92.6±0.9	94.0±1.5	3
2.0	98.9±0.4	96.0±0.5	96.4±0.6	95.6±0.6	95.1±1.0	94.0±0.7	3
5.0	99.3±0.6	98.5±0.7	98.3±0.7	97.0±0.4	99.9±0.6	98.3±2.0	3
Refrigeration (4°C)							
0.1	99.7±0.5	96.3±0.9	93.3±0.8	91.0±0.4	91.7±0.7	90.7±1.1	3
0.2	99.5±0.3	98.7±0.6	93.1±0.6	90.5±0.8	90.0±0.9	86.5±1.0	3
0.5	99.6±0.3	98.0±0.8	96.3±0.6	96.0±0.5	97.1±0.5	96.1±0.7	3
1.0	100.2±0.2	101.0±0.7	97.2±0.3	98.9±0.4	96.4±0.8	94.7±0.7	3
2.0	99.6±0.3	99.7±0.5	98.7±0.5	98.9±0.6	102.2±0.9	97.1±0.5	3
5.0	100.0±0.4	99.3±0.6	100.3±0.5	99.4±0.2	100.3±0.3	99.2±0.7	3

Table 5. Level of oxolinic acid in oliver flounder (*Paralichthys olivaceus*), red sea bream (*Pagrus major*), sea bass (*Lateolabrax japonicus*), black rock fish (*Sebastes schlegeli*) being cultured in fish farm and in live eel (*Anguilla japonica*) purchased from market place in Busan area

Survey Time	Location	Fish species	Oxolinic acid (mg/kg)	Number of Samples
Sep.-Nov. 2001	Tongyoung	Oliver flounder	ND	5
	Janghung	Oliver flounder	ND	50
	Wando	Oliver flounder	ND	34
Jan.-Mar. 2002	Kijang market in Busan	Eel	ND	21
	Bujun market in Busan	Eel	ND	18
Apr.-Oct. 2003	Busan	Oliver flounder	ND	18
	Tongyoung	Red sea bream	ND	28
		Sea bass	ND	19
		Black rock fish	ND	15
	Geoje	Oliver flounder	ND	6
		Sea bass	ND	18
	Yeosu	Black rock fish	ND-0.004	18
	Wando	Oliver flounder	ND-0.068	18
		Black rock fish	ND	18
Jeju	Oliver flounder	ND	33	
Apr.-Oct. 2004	Busan	Oliver flounder	ND	18
	Tongyoung	Red sea bream	ND	18
		Sea bass	ND	18
		Rock fish	ND	18
	Geoje	Oliver flounder	ND	18
		Sea bass	ND	18
	Yeosu	Black rock fish	ND	18
		Oliver flounder	ND	18
	Wando	Black rock fish	ND	18
		Oliver flounder	ND	18
	Jeju	Oliver flounder	ND	36
Total				517

ND: Not detected.

및 완도의 12개 양식장, 2003년과 2004년도에는 부산, 경남 거제, 전남 완도 및 제주도 4개 지역 넙치양식장을 대상으로 4월부터 10월까지 총 254점의 시료를 분석하였고, 참돔은 통영의 양식장 1개소에서 2003년과 2004년도 4월에서 10월에 46개, 농어는 통영, 여수 2개 지역에서 2003년과 2004년도

4월에서 10월에 73점, 조피볼락은 거제, 여수, 완도 3개 지역에서 2003년과 2004년도 4월에서 10월에 105점을 대상으로 실시 하였으며, 총 478점의 양식장에서 채취한 시료를 분석하였다. 그리고 모니터링 과정 중 탐문 조사를 실시, 각 양식장에서의 항생제 사용 이력을 확인하여, 항생제 사용이력이 있는 곳과

없는 곳으로 구분하여 모니터링 결과를 분석하였다. 뱀장어의 경우, 양식장에서의 시료 구득이 어려워 2002년 1월에서 3월에 부산 시내의 시장에서 유통되고 있는 활뱀장어를 대상으로 39점에 대하여 모니터링을 실시하였으며, 총 33개소의 양식장을 대상으로 517개 시료를 분석하였다(Table 5).

옥소린산의 잔류농도는 2001년, 2002년 및 2004년에는 검출되지 않았으며 2003년 여수지역의 조피볼락 및 완도지역의 넙치양식장에서 불검출-0.068 mg/kg이 검출되었다. 수산물에서의 옥소린산 잔류 허용기준치는 2004년까지 뱀장어에서만 불검출로 규정되어있으며 2005년 현재 0.1 mg/kg으로 식품의약품안전청에 입안예고(2005년 8월1일) 중에 있다. 양식중인 어류 조사시료 478점 중에서 기준치를 초과한 시료는 없었다. 한편 2002년 부산 시내의 시중에 유통 중인 활뱀장어를 대상으로 시험 분석한 결과 옥소린산은 검출되지 않았다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물과학원의 이화학적 위생안전위해관리 연구 및 해양수산부의 해양수산연구개발사업인 생산·출하 전 단계 수산물에 대한 위해요소중점관리기준 설정 및 표준모델 개발에 관한 연구의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다 (RP-2005-FS-005).

## 참 고 문 헌

- Chun, S.K. 1992. Guidance for use of aquaculture medicine. In: Disease of marine farmed fish. Susan Times, Seoul, 126-131.
- Hamamoto, K. 1986. Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in chicken plasma. J. Chromatogr. B, 381, 453-456.
- Horii, S., C. Yasuoka and M. Matsumoto. 1987. High-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acids in cultured fish. J. Chromatogr. A, 388, 459-466.
- Hustvedt, S.O., R. Salte and V. Vassik. 1991. Absorption, distribution and elimination of oxolinic acid in *Atlantic salmon* after various routes of administration. Aquaculture, 95, 193-199.
- Ikai, Y., H. Oka, N. Kawamura, M. Yamada, K. Harada, M. Suzuki and H. Nakazawa. 1989. Improvement of chemical analysis of antibiotics: XVI. Simple and rapid determination of residual pyridonecarboxylic acid antibacterials in fish using a prepacked amino cartridge J. Chromatogr. A, 477, 397-406.
- Inglis, V. and R.H. Richards. 1991. The *in vitro* susceptibility of *Aeromonas salmonicida* and other fish pathogenic bacteria to 29 antimicrobial agent. J. Fish Dis., 14, 641-650.
- Jacobsen, M.D. 1989. Withdrawal times of freshwater rainbow trout after treatment with oxolinic acid, oxytetracycline and trimethoprim. J. Fish Dis. 12, 29-36.
- Jeong, H.D. and S.K. Chun. 1992. The utilization of antibiotics and the treatment of bacterial diseases in fish. J. Fish Pathol., 5, 37-48.
- Kasuga, Y., A. Sugitani and F. Yamada. 1982. Simultaneous determination of oxolinic, nalidixic and piromidic acids in fishes by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Jpn., 23, 344-347.
- KAHPA (Korea Animal Health Products Association). 2001. The Guidebook of Veterinary Antibiotics, KyungSung MunhwaSa, GyeongGi-Do, 645-653.
- KFDA (Korea Food and Drug Administration). 2000. Korea Food Code (A supplementary), Chapter 7. General method for examination, Munyoungsa, Seoul, 363-365.
- Kim, K.H., M.R. Song, S.N. Choe, M.S. Choe and K.H. Park. 1998. Oxolinic acid residue in the cultured eel tissues and its change to heating process. J. Fd. Hyg. Safety, 13, 14-19.
- KQS (Kobe Quarantine Station). 1996. Analysis of synthetic antimicrobials in livestock and seafood products imported. - Rapid determination of residual synthetic antibacterials in fish and meat by HPLC with linear gradient elution. Bull. Kobe Quarant. Station, 1-7.
- Larocque, L., M. Schnurr, S. Sved and A. Weninger. 1991. Determination of oxolinic acid residues in salmon muscle tissue by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 74, 608-611.
- Nose, N., Y. Hashino, Y. Kikuchi, M. Horie, K. Saitoh, T. Kawachi and H. Nakazawa. 1987. Simultaneous liquid chromatographic determination of residual synthetic antibacterials in cultured fish. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 70, 714-717.
- Pouliquen, H. and F. Armand. 2000. Determination of oxolinic acid in faeces and turbot (*Scophthalmus maximus*) by high-performance liquid chromatography using fluorescence detection. J. Chromatogr. B, 749, 127-133.
- Ueno, R., M. Okumura, Y. Horiguchi and S.S. Kubota. 1988. Levels of oxolinic acid in cultured rainbow trout and amago salmon after oral administration. Nippon Suisan Gakkaishi, 54, 485-489.

2005년 11월 14일 접수

2005년 12월 26일 수리