

## HPLC를 이용한 어패류 중의 fluoroquinolone계 항균제의 분석법

조미라\* · 김풍호 · 이희정 · 이태식  
국립수산과학원 식품위생팀

### A New Analytical Method for Fluoroquinolones in Fisheries Products by High Performance Liquid Chromatography

Mi Ra JO\*, Poong Ho KIM, Hee Jung LEE and Tae Seek LEE  
Food Sanitation Research Team, National Fisheries Research and Development Institute, Busan 619-902, Korea

Fluoroquinolones are the most common group of antibacterial agents currently used in the Korean aquaculture industry, and use of these agents has been increasing steadily. High performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection was used for the simultaneous determination of five fluoroquinolones in fish and shellfish: ofloxacin (OFL), pefloxacin (PEF), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), and enrofloxacin (ENRO). Fish and shellfish muscle was homogenized, and protein, lipid, and low molecular weight pigments were then excluded from the homogenate. The final eluates were analyzed by HPLC equipped with a Shiseido UG-120 type C18 reverse-phase column (4.6×250 mm, 5 μm) and a fluorescence detector (excitation at 280 nm, emission at 450 nm). The mobile phase was 0.1 M phosphoric acid and acetonitrile solution (91:9, v/v) and tetrahydrofuran (THF) was added to it at a rate of 5 mL per a liter of the mobile phase. Adequate chromatography separation was obtained using the above method. Average recoveries of fortified samples at levels from 0.05 to 0.5 mg/kg were 72.3±2.5-84.5±1.2% for OFL, 82.7±3.3-109.3±7.5% for NOR, 85.3±6.6-116.0±7.9% for PEF, 76.0±4.3-109.3±12.4% for CIP, and 78.7±5.9-100.0±9.8% for ENRO. The limit of detection of OFL was 5 μg/L, the others were 1 μg/L. We concluded that the new analytical method was suitable for the determination of fluoroquinolones in fish and shellfish.

Key words: Fluoroquinolones, Ofloxacin, Norfloxacin, Pefloxacin, Ciprofloxacin, Enrofloxacin, HPLC

#### 서 론

1970년대부터 각종 어류에 대한 양식기술이 개발됨으로써 1980년대 이후 넙치, 조피볼락 등 고급 어종을 중심으로 급속히 발전하여 육상수조식과 해상가두리의 규모가 기업형 양식으로 확대되었으며, 양식의 개발여건에 따라 양식 생산량도 급속히 증가하게 되었다(Heo et al., 2002). 이러한 생산량의 증가와 더불어 어류질병 방지를 위하여 많은 항균물질을 사용하게 되었고(Horie et al., 1995), 어류 양식장에서의 항생물질의 오·남용으로 인하여 세균에 있어서 그 내성을 증가시켜 질병에 의한 경제적 손실과 약제의 효력 감소는 물론 식품중에 항균물질이 잔류로 인한 저농도 항생제의 장기섭취와 인체에 미치는 영향이 심각하게 문제시 되고 있다(Heo and Ko, 1996; Heo et al., 1992).

Quinolone 제제는 1962년 nalidixic acid가 최초로 발견된 이래 항균범위와 항균력을 개선하기 위하여 quinoline을 기본 구조로 하는 합성물들이 만들어져, 25개 이상의 유도체들이 합성되어져 왔으며(Pecorelli et al., 2003), 이후 이들 제제의 효능을 개선하여 quinolone의 6번 탄소위치에 불소(F)를 첨가함으로써 항균력의 범위가 더욱 넓어진 2세대 quinolone인

fluoroquinolone계열 항균제가 개발되었다(Lesher et al., 1992).

Fluoroquinolone계 항균제는 세균 세포의 DNA전사에 관여하는 topoisomerase II (DNA gyrase)를 억제하여 살균작용을 나타내며 다단변이(multistep mutation)에 의해 내성이 유발되므로 내성균의 출현가능성이 낮은 것으로 보고되고 있다(Kang et al., 1997). 이 항균제는 sulfa제, β-lactam계, aminoglycoside계, tetracycline계, macroride계 항생물질에 내성을 가진 균주뿐만 아니라 그람음성세균, 그람양성세균, *Mycoplasma* spp. 등에 이르기까지 광범위하게 작용하기 때문에(Posyniak, et al, 1999), 이미 fluoroquinolone계는 임상에서 장관계 및 호흡기계 감염의 예방치료에 사용되고 있고 현재 축산 및 어류의 세균성 질병의 예방 및 치료하는데 효과적으로 사용하고 있다(Heo and Ko, 1996; Kaatz et al., 1987).

일반 식품 중에서 quinolone계를 비롯한 fluoroquinolone계 항균제를 분석하는 방법으로는 스크리닝법으로서 미생물학적인 분석법(Bogaerts and Brussels, 1980; Meetschen and Petz, 1990; Smither, 1978)과 효소 면역측정법(Son, 1996), 박층크로마토그래피법(Juhel and Abjean, 1998), 액체크로마토그래피법(Yorke and Forc, 2000; Gigosos et al., 2000; Espinosa-

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

Mansilla et al., 2006.)이 있으며, 특히 HPLC를 이용한 방법은 적용대상이 넓고 감도도 우수하여 정확하고 과학적인 data의 제공 및 농·축·수산물물의 수출입시 발생될 수 있는 무역마찰에 대비한 정확한 정성 정량을 목적으로 개발되고 있다.

그러나 지금까지 식품 중에서 fluoroquinolone계 항균물질 분석방법 개발은 축육 및 가공류를 대상으로 한 것이 대부분이었으며, 수산물에서는 어류의 혈청을 대상으로 하는 분석방법이 개발되어 있고, 어류 및 패류 등 수산식품을 대상으로 개발된 경우는 그리 많지 않다. 축산물과 혈청을 대상으로 개발된 시험방법들은 수산식품 분석에 부적합한 경우가 많은 것으로 본 연구에서 확인되었으며 수산물을 대상으로 한 몇몇의 분석방법도 기기분석에서 가장 중요한 부분을 차지하고 있는 회수율에서 문제점이 있는 것으로 나타났다.

본 연구는 fluoroquinolone계 항균제 중 수산용 의약품으로 승인되어 제조 판매되고 있는 5종, ciprofloxacin (CIP), norfloxacin (NOR), enrofloxacin (ENR), pefloxacin (PEF), ofloxacin(OFL)을 기존의 연구자들의 방법을 수정 개량하여 보다 간편하고 회수율을 높이면서 동시에 분석할 수 있는 방법을 확립하였다.

## 재료 및 방법

### 표준품 및 시약

표준품으로 사용한 fluoroquinolone계열은 ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENR), pefloxacin (PEF), ofloxacin (OFL)은 Dr. Ehrestorfer GmbH(Germany)사 제품을 사용하였고, norfloxacin (NOR)은 Sigma제품(St. Louis, MO, USA)을 사용하였다. Acetonitrile, methanol, tetrahydrofuran(THF)은 HPLC grade(Merck Co., Germany)를 사용하였으며, 증류수는 J&B (SK chemical, Korea), phosphoric acid는 Sigma(USA)사 제품을 사용하였다.

### 분석기기

본 실험에서 HPLC를 사용하여 fluoroquinolone계열 항균제를 분석하였다. 시료 전처리에는 homogenizer (Polytron PT 3000), 원심분리기(Hanil Supra 21k, Korea), 감압농축기(EYELA N-2NW, Japan) 및 syringe filter 등을 사용하였다. Centrifuge tube (50 mL polypropylene, Cat. No. 25330-50, Corning, USA), plastic syringe (1 mL, 26G×½, Sung Shim medical Co., LTD., Korea), syringe filter (PTFE-membrane 0.2 μm, minisart SRP 15, Sartorius, Germany)는 시료 전처리 과정에서 사용하였다.

Chromatography system은 pump (Shiseido nanospace SI-2, Japan), autosampler (Sil-10AD vp, Shimadzu, Japan), fluorescence detector (Spectra-Physics FL 3000, USA)와 data system은 dsCHROM (Version 2000, Donam Instrument Inc, Korea)를 사용하여 분석하였다.

### 표준용액의 제조

Fluoroquinolone계 항균제의 표준품 5성분을 각각 10 mg씩

정량하여 0.1 N NaOH를 소량 가하여 녹인 후 100 mL 용량 플라스크에 methanol로 정용(100 μg/mL)한 것을 stock solution으로 하였으며, stock solution은 냉장보관에서는 2개월까지 안정하였다. Working solution은 냉장보관시 20일간, 상온에서는 3일간 안정한 것으로 확인되었지만, 본 연구에서는 매 실험시 마다 working solution을 제조하여 사용하였다.

### 이동상 용매의 조제

Fluroquinolone계 항균제 5성분의 분리를 위하여 이동상의 조성을 검토하였다. 즉 acetonitrile과 phosphoric acid (pH 3.5)의 적당한 비율로 retention time을 조정된 후 phosphoric acid 농도, acetonitrile 비율, pH, column 온도 등을 고려하여 최적 조건을 선택하였다.

### 표준곡선의 작성 및 계산

표준용액을 각각 10 mL 정용플라스크에 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 mL씩 취하고 이동상으로 표시선까지 채워 최종농도가 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 μg/mL이 되도록 희석하였다. 5개 농도의 희석된 표준용액 CIP, NOR, PEF, OFL 및 ENRO는 20 μL씩 3회 반복 주입하여 얻은 chromatogram으로부터 각각의 fluoroquinolone계에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다.

$$\text{시료중 항균제의 농도} = \frac{\text{시료의 피크면적}}{\text{표준용액 피크면적}} \times \frac{\text{표준용액농도}}{\text{시료무게}}$$

시험용액 분석에서 얻은 chromatogram으로부터 각 성분에 대하여 머무름 시간이 일치되는 각각의 peak에 대한 평균면적을 구한 다음 검량선 좌표의 Y축에 동일한 값을 표시하고 이 값과 검량선상 만나는 점에서 수직으로 X축과 만나는 점이 시험용액의 농도를 나타낸다. 이 농도에 시험용액의 희석배수(잔류물에 가한 이동상의 부피)를 곱하고 시료 무게로 나누어 최종 시료 중 각 성분의 농도를 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### Fluoroquinolone계 항균제의 최적 분석조건 구명

Fluoroquinolone계 항균제의 동시 분석을 시도한 여러 연구에서 항균물질의 분석용 이동상으로는 acetonitrile과 phosphoric acid 완충용액이 주로 사용되고 있다(Gigosos et al., 2000; Horie et al., 1995). 이들 대부분의 연구는 축산물의 근육이나 혈청을 분석하는 방법으로 수산물에 적용하기에는 색소나 저분자 화합물이 방해물질로 작용하여 정확한 분석을 기대하기가 어려웠다.

본 연구에서는 축산물이나 어류의 혈청으로부터 분석하는 Gigosos et al. (2000), Yorke and Froc (2000), Jo (2003), Sim et al. (1998) 및 Espinosa-Mansilla et al. (2006)의 조건을 참고로 하여 수산식품 중에 잔류하는 미량의 fluoroquinolone계 항균물질 5종 ofloxacin (OFL), norfloxacin (NOR), pefloxacin (PEF),

ciprofloxacin (CIP) 및 enrofloxacin (ENRO)을 동시에 분석할 수 있는 최적분석조건 및 방법을 구명하였다.

Horie et al. (1992)이 fluoroquinolone계 열 항균제를 분석하기 위하여 이동상으로 역상크로마토그래피에서 이용한 water-acetonitrile 및 인산완충액-acetonitrile를 이용해서 분리 조건을 검토한 결과, 인산완충액-acetonitrile를 이용한 쪽이 tailing을 보다 효과적으로 억제할 수 있었다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서는 Horie et al. (1992)의 방법을 바탕으로 5종의 fluoroquinolone계 항균제 표준물질을 효과적으로 분리하기 위하여 0.1 M phosphoric acid (pH 3.5)와 acetonitrile (85:15, v/v)의 이동상을 사용하였다. 그 결과, 2-3종의 fluoroquinolone계 항균제의 분리에 있어서는 peak 형태 및 분리도가 아주 양호하였지만, 11.29분의 OFL과 11.24분의 CIP의 retention time이 겹쳐져 나왔으며, NOR과 PEF의 분리능이 떨어져 fluoroquinolone계 항균제 5종을 동시에 분석하기에는 불가능하였다. 따라서 수산용 항균제를 동시에 분석하기 위해서는 다른 적절한 이동상의 조건의 검토가 필요하였다(Data not shown).

본 실험에서는 이동상의 pH는 0.1 M phosphoric acid 용액을 만들어 10 N NaOH로 pH를 각각 pH 2.0, pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5로 조절한 후 acetonitrile과의 조성비율을 90:10으로 혼합하여 분석한 결과 항균물질의 retention time 및 분리능은 pH 2.5에서 가장 양호하였으며 면적값도 약간 높게 나타나 이동상의 pH를 2.5로 조정하였다.

또한 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M의 phosphoric acid의 용액 농도로 조정된 후 분석한 결과 0.01 M 및 0.05 M의 인산농도에서는 항균물질 peak의 retention time이 중첩되어 표준물질들이 완전히 분리되지 않았고, 0.1 M의 농도에서도 완전히 분리되지는 않았으나 다른 농도에 비해서 가장 양호한 분리도를 나타내었다.

이동상의 적절 혼합비율을 구명하기 위하여 0.1 M phosphoric acid와 acetonitrile의 농도를 90:10, 91:9, 92:8의 비율로 혼합하여 분석한 결과, 90:10의 조성비율에서는 16분대에 OFL이 첫 peak로 나왔지만 두 번째, 세 번째로 검출되는 NOR 및 PEF의 peak가 완전히 분리되지 않았다.

또한 이동상의 92:8 조성비율에서는 5종의 표준물질이 모두 검출되었지만 분석시간이 상당히 길어서 적당하지 않았다. 그러나 91:9의 조성비율에서는 5성분의 peak가 완전히 분리되어 아주 양호한 분리능을 나타내었다.

한편, peak의 형태와 분리능을 향상시키기 위하여 Horie et al. (1994)은 ion paring 시약인 heptansulfonic acid를, York and Froc (2000)은 tetrahydrofuran을, Silvia et al. (2003)은 tetramethylammonium hydroxide를 사용하여 fluoroquinolone계 항균제의 동시분석을 시도하였다. 본 연구에서는 tetrahydrofuran (THF)를 이용하여 peak의 형태와 분리능을 개선하고자 이동상에 첨가하였다. 0.1 M phosphoric acid (pH 2.5)와 acetonitrile의 혼합비율을 91:9로 조정된 후에 이동상 L당 THF

를 3 mL, 5 mL 및 10 mL를 각각 첨가하여 peak 형태 및 분리도를 비교하였다. 그 결과 THF를 첨가하였을 때가 첨가하지 않은 것에 비하여 각 peak간의 분리도가 현저히 증가하였고 THF를 10 mL 첨가하였을 때는 NOR 및 PEF가 전혀 분리되지 않았으며, 3 mL 첨가한 경우는 OFL, NRO 및 PEF가 분리는 되었으나, 분리도가 떨어져 peak간의 구별이 어려웠다. 따라서 THF를 5 mL 첨가한 경우가 항균물질 성분간 peak가 가장 양호하게 분리되었다.

Gigosos et al. (2000)는 278 nm의 UV에서 fluoroquinolone계 항균제를 검출하였으나 다른 연구자들은 UV검출기보다는 형광검출기에서 깨끗한 chromatogram을 나타낸다고 하여 (Yorke and Froc, 2000) 지금까지 구명한 최적 이동상으로 형광 (Ex=280 nm, Em=450 nm)과 UV (278 nm)검출기의 chromatogram을 비교하였다. 그 결과 UV 검출기를 사용하는 것보다 형광검출기를 사용하는 쪽이 협잡물의 retention time 영향을 받지 아니하고 peak 면적비로 비교했을 때 약 5배의 고감도로 5종의 fluoroquinolone계 항균제를 검출 정량이 가능하였다.

따라서 본 연구에서 구명한 수산용 fluoroquinolone계 항균물질 5종을 동시에 분석할 수 있는 HPLC 최적분석조건은 Table 1과 같다. Shiseido UG 120 column (250×4.6 mm i.d.)으로 이동상을 0.1 M phosphoric acid (pH 2.5)와 acetonitrile을 91:9의 비율로 하여 형광 검출기의 검출파장 280 nm, 여기파장 450 nm에서 1 mL/min의 유속으로 분석하였으며 column 온도를 30°C로 고정하였다. Injection량은 20 µL를 주입하였고, 완료시간은 50분으로 하여 분석하였다.

Table 1. HPLC conditions for five fluoroquinolones determination in fish and shellfish

Item	Analysis condition
HPLC system	Shiseido nanospace SI-2
Mobile phase	Acetonitrile : 0.1 M Phosphoric acid (Added to tetrahydrofuran 5 mL, pH 2.5) = 9 : 91
Detector	Fluorescence Ex. 280 nm, Em. 450 nm
Column	Shiseido UG-120 type C18, 4.6 mm ID x 250 mm
Flow rate	1 mL/min.
Column temp.	30°C
Injection volume	20 µL

수산물 중에서 fluoroquinolone계 항균제 추출 조건 및 분석결과

기존의 Nagao et al. (1998)이 보고한 방법을 검토한 결과 시료의 양과 최종 HPLC 분석용 시료를 용해하는 방법에 문제가 제기되었다. 시료의 양이 0.5 g으로 수산물과 같이 부위별로 체성분이 다양한 시료에서는 시료 전체를 대표하기에는 너무 부족하여 분석의 재현성이 떨어져 신뢰할 수 없는 값이 예상되었다. 따라서 보다 정확하고 항생제의 검출한계를 높이기 위하여 Nagao et al. (1998) 방법을 보완하여 분리능과 재현

성이 높은 분석값을 얻기 위하여 여러 가지 방법으로 전처리 방법을 변형하였다. 우선 단백질을 제거하기 위하여 가열방식을 채택하는 등의 기존의 방법을 수정하여 Fig. 1과 같은 전처리 방법을 확립하였으며, 분석조건은 앞에서 구명한 방법으로 분석하였다. 즉, 어류의 껍질을 벗긴 후 펠렛을 뜬 어육을 잘게 마쇄하여 시료를 조제한 다음, 어육 시료를 5 g 취하여 phosphoric acid 및 acetonitrile 그리고 THF를 혼합한 이동상과 acetonitrile을 1:1로 섞은 혼합액 40 mL를 가하여 2분간 균질화시켰다. 이 균질액을 80°C에서 수욕중에서 10분간 중탕으로 열처리하여 단백질을 석출시킨 다음 방냉하여 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 단백질을 제거한 상층액을 분액여두에 옮겨 n-hexane 50 mL를 가하여 조용히 흔들어서 지질을 제거하며 그 하층액(추출액)은 n-propanol 10 mL을 넣어 40°C에서 잔사만이 남을 때까지 감압농축하였다. 이 건고물을 이동상 2.5 mL을 가하여 충분히 용해시킨 다음 0.2  $\mu\text{m}$  여과지(PTFE, Millipore)로 여과한 후, HPLC로 분석하였다. 시료 추출액은 상온보관에서 30일째까지, 냉장보관 하였을 경우는 37일까지는 아주 안정하였다.

Fluoroquinolone계 표준품 0.1 mg/kg (a), 어류 blank (b) 및

어류에 fluoroquinolone계 항균물질 5성분을 0.1 mg/kg되도록 첨가하여 추출한 뒤 분석한 chromatogram (c)은 Fig. 2에 나타내었다. 수산물의 blank 시료를 분석한 chromatogram (b)에서와 같이 수산물의 색소나 기타물질에 의한 방해 peak가 없이 peak를 얻을 수 있었으며, 수산물에 fluoroquinolone계 항균물질을 첨가하여 추출한 chromatogram에서도 첨가한 항균물질 외에는 다른 방해 peak가 검출되지 않았다. 따라서 본 방법은 수산물 중의 fluoroquinolone계 항균물질 5성분을 동시에 분석하는 분석법으로 아주 적합한 추출조건 및 분석조건이라고 판단되었다.

#### 표준용액 검량선

Fluoroquinolone계열 항균물질의 표준검량선은 0.1-2.0 mg/kg에서 결정계수( $r^2$ )가 0.999 이상의 아주 양호한 직선성을 나타내었다. 각 성분별 직선 회귀식은 다음과 같다(Fig. 3). 즉, OFL,  $y=34166583x-296556$  ( $R^2=0.9999$ ); NOR,  $y=168355945x-1311387$  ( $R^2=0.9999$ ); PEF,  $y=198740896x-1614622$  ( $R^2=0.9999$ ); CIP,  $y=99898291x-536259$  ( $R^2=0.9999$ ); enrofloxacin은  $y=188376508x+7025408$  ( $R^2=0.9999$ )이었다.

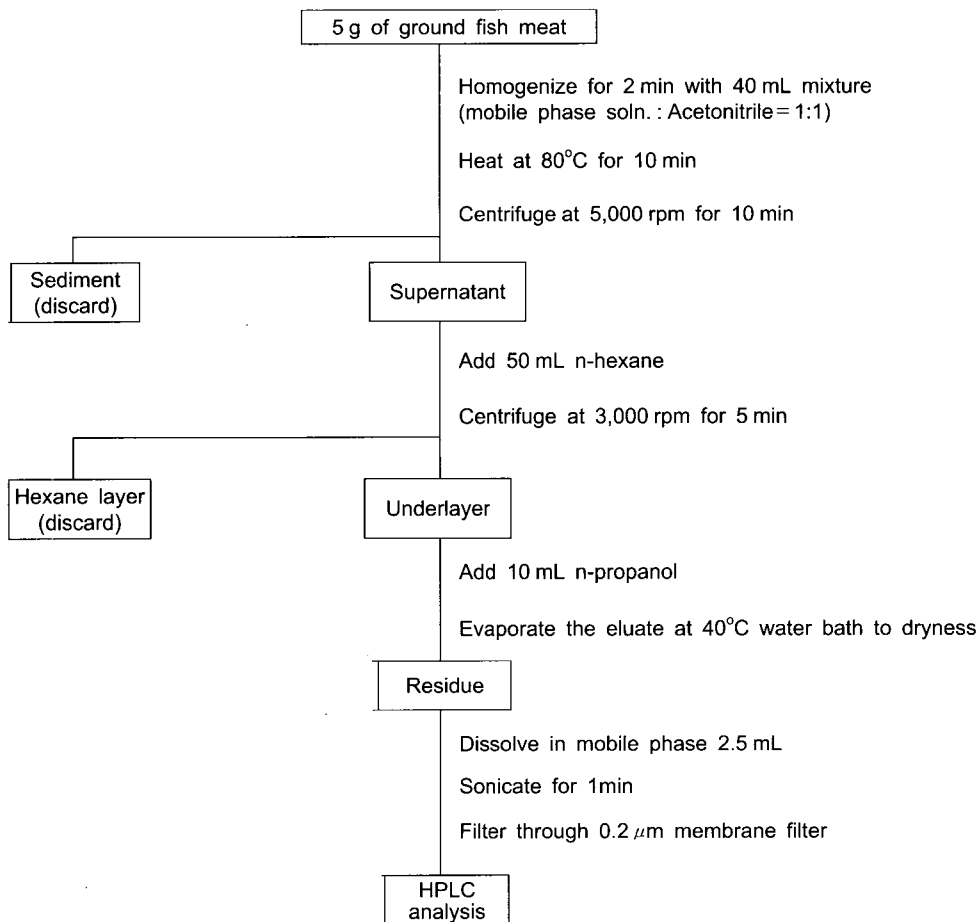


Fig. 1. Extraction procedure for the analysis of fluoroquinolones in the fish and shellfish muscle.

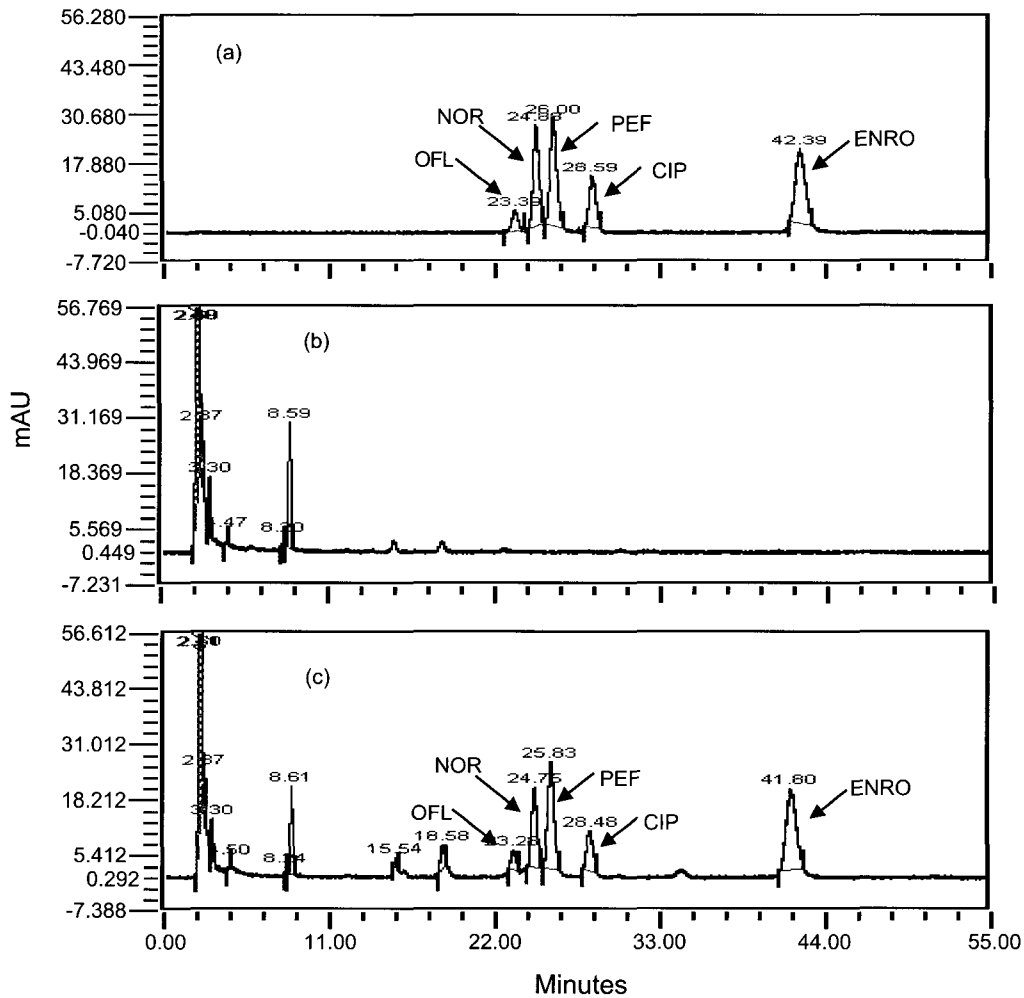


Fig. 2. HPLC chromatogram of fluoroquinolone in standard solution and spiked in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) (a), Standard solution; (b), Blank sample; (c), Spiked sample.

#### 어류 및 패류에서의 회수율

본 분석방법으로 수산용 fluoroquinolone계 항균제를 분석하는 경우 검출한계는 신호대 잡음비 3:1을 기준으로 설정하여 구하였다. 측정결과 0.1, 0.01, 0.001 mg/kg의 농도에서는 OFL을 제외한 항균제들은 peak가 뚜렷이 분리된 반면, 0.0005 mg/kg의 농도에서는 baseline에서 peak를 구분하기 어려웠다. 그리고 OFL은 0.001 mg/kg에서 baseline과 peak의 구분어 어려웠지만, 0.005 mg/kg에서는 peak가 구분 되었다. 따라서 본 연구에서 개발한 방법으로 fluoroquinolone계 항균제 5성분을 동시분석할 때의 검출한계는 OFL은 0.005 mg/kg, 그 외 항균물질은 0.001 mg/kg으로 판단되었다.

넙치 및 굴 중의 fluoroquinolone계 항균제 5종의 회수율을 측정하기 위하여 fluoroquinolone계 항균물질이 잔류하지 않은 어패류 시료에 5종의 항균물질을 각각 0.05, 0.1 및 0.5 mg/kg 첨가한 다음 시료에 대한 전처리의 과정을 거쳐 추출하여 HPLC로 분석하였다. 3회 반복 시험하여 얻은 평균 회수율

은 Table 2에 나타내었다. Fluoroquinolone계 항균물질의 회수율은 어패류의 종류에 따라 약간의 차이가 났다. 항균물질과 첨가농도에 관계없이 넙치의 회수율이 패류보다 높았다. 넙치의 회수율은 OFL이 각 농도별로 72.3-84.5%로 가장 낮았으며, 그 외 항균물질에서는 95% 이상의 높은 회수율을 나타내었고, CV (coefficient of variation)값도 6.45-12.45%로 아주 양호한 값을 나타내었다. 굴의 회수율은 5성분 항균제 모두 76.0-92.7%의 회수율을 범위를 나타내었다.

Nagao et al. (1998)은 돼지근육에서 OFL이 0.5 mg/kg에서  $86.0 \pm 4.5\%$ , 0.25 mg/kg에서 ENRO는  $86.3 \pm 4.4\%$ 의 회수율을 보고하였으며, Gigoso et al. (2000)은 닭과 계란에서 0.5-1 mg/kg를 첨가한 후에 측정된 회수율에서 NOR이 98% 이상의 회수율을 보인 반면, CIP와 ENRO는 70-80%의 회수율을 보고하였다. 본 연구에서의 회수율은 어류에서는 CIP 및 ENRO가 95% 이상의 아주 높은 회수율 보였고 패류에 있어서는 76-90%의 약간 낮은 회수율을 나타내었으나, Codex에서 정한 회수율

Table 2. Average recovery (%) of five fluoroquinolones from muscle of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) and oyster (*Crossostrea gigas*)

Species	Fluoroquinolones	Spiked amount					
		0.05 mg/kg		0.1 mg/kg		0.5 mg/kg	
		Recovery $\pm$ S.D. <sup>1)</sup> (%)	CV <sup>2)</sup> (%)	Recovery $\pm$ S.D. (%)	CV (%)	Recovery $\pm$ S.D. (%)	CV (%)
Olive flounder	Ofloxacin	72.3 $\pm$ 2.5	3.60	83.3 $\pm$ 2.1	2.47	84.5 $\pm$ 1.2	1.45
	Norfloxacin	102.7 $\pm$ 9.0	8.76	103.3 $\pm$ 1.2	1.21	109.3 $\pm$ 7.5	6.86
	Pefloxacin	105.3 $\pm$ 6.8	6.45	116.0 $\pm$ 7.9	6.79	107.9 $\pm$ 8.6	7.97
	Ciprofloxacin	109.3 $\pm$ 12.4	12.45	104.3 $\pm$ 2.1	1.97	103.5 $\pm$ 8.2	7.91
	Enrofloxacin	94.7 $\pm$ 9.3	8.81	97.3 $\pm$ 0.5	0.48	100.0 $\pm$ 9.8	9.76
Oyster	Ofloxacin	81.3 $\pm$ 9.0	11.06	78.0 $\pm$ 7.8	9.99	83.4 $\pm$ 1.0	1.22
	Norfloxacin	92.7 $\pm$ 2.5	2.69	82.7 $\pm$ 3.3	3.99	85.3 $\pm$ 4.8	5.62
	Pefloxacin	85.3 $\pm$ 6.6	7.73	86.7 $\pm$ 6.3	7.32	85.4 $\pm$ 2.1	2.50
	Ciprofloxacin	76.0 $\pm$ 4.3	5.68	78.3 $\pm$ 7.7	9.85	90.7 $\pm$ 1.1	1.20
	Enrofloxacin	78.7 $\pm$ 7.4	9.36	78.7 $\pm$ 5.9	7.51	90.5 $\pm$ 1.2	1.31

<sup>1)</sup>S.D; Standard deviation, <sup>2)</sup>CV; coefficient of variation.

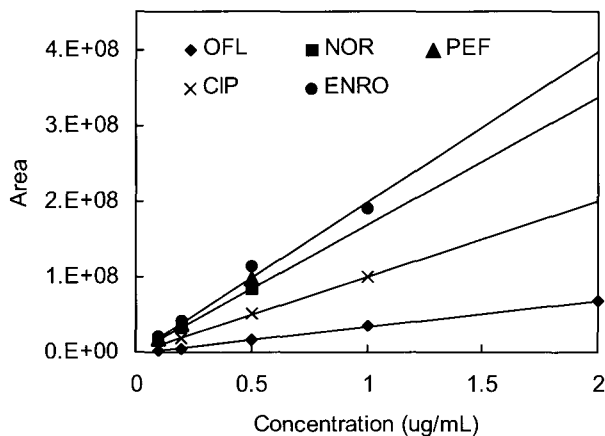


Fig. 3. Standard calibration curves of fluoroquinolones.

허용범위 보다 높은 양호한 분석범위를 확인하였다.

Horie et al. (1993)이 개발한 ENRO의 회수율은 참돔과 방어에서 80.2-84.2%, 뱀장어에서 83.1%보다 높은 회수율을 나타내었다. Codex에서 정한 규격에 의하면 잔류허용기준의 0, 0.5 $\times$ , 1 $\times$  및 2 $\times$ 의 농도로 시료에 표준물질을 첨가하여 시험하였을 때 시료간의 분석오차의 척도인 변이계수 CV의 허용범위는 농도  $\leq$ 0.001 mg/kg인 경우 35%, 0.001 mg/kg<농도 $\leq$  0.01 mg/kg인 경우 30%, 0.01 mg/kg<농도 $\leq$ 0.1 mg/kg인 경우 20%, 0.1 mg/kg<농도인 경우 15%이며, 회수율 허용범위는 농도  $\leq$ 0.001 mg/kg인 경우 50-120%, 0.001 mg/kg<농도 $\leq$ 0.01 mg/kg인 경우 60-120%, 0.01 mg/kg<농도 $\leq$ 0.1 mg/kg인 경우 70-110%, 0.1 mg/kg<농도인 경우 80-110%로 권고되어 있다 (Choi et al., 2005). 본 방법에서의 시료간의 분석오차인 CV값은 5성분 모두 농도에 관계없이 10% 미만의 양호한 값을 나타내었으며, 회수율 어류에서는 OFL을 제외하면 100%의 회수율을 나타내었으며, 패류에서도 80% 이상의 회수율을 나타내어 아주 양호한 분석법이라고 판단되었다.

## 사 사

본 연구는 국립수산물품질관리원 이화학적 위해관리연구의 연구비 지원에 의해 수행되었습니다(RP-2006-FS-001).

## 참 고 문 헌

- Bogaerts, R. and F.W. Brussels. 1980. Standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substance in fresh meat. *Fleischwirtsch*, 60, 672-673.
- Choi, D.M., J.Y. Jeong, M.I. Chang, M.H. Im, K.S. Park and M.K. Hong. 2005. Determination of tetracycline antibiotics in food. *Anal. Sci. Tech.*, 18, 250-256.
- EMA (European Medicines Agency). 2002. The European agency for the evaluation of medicinal products veterinary medicines and inspections, Committee for veterinary medicinal products, Enrofloxacin, Summary report (5). EMA/MRL/820/02-FINAL. London, UK.
- FDA. 2003. Approved animal drug products by center for veterinary medicine, NADA 140-828, 21 CFR 520.813. USA.
- Espinosa-Mansilla, A., A.M. de la Pena, D. Gonzalez Gomez and F. Silinas Lopez. 2006. Determination of fluoroquinolones in urine and serum by using high performance liquid chromatography and multiemission scan fluorimetric detection. *Talanta*, 68, 1215-1221.
- Gigosos, P.G., P.R. Revesado, O. Cadahia, C.A. Fente, B.I. Vazquez, C.M. Franco and A. Cepeda. 2000. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J. Chromatogr. A*, 871, 31-36.
- Heo, G.J., K.S. Shin and M.H. Lee. 1992. Diseases of

- aquaculture animals and prevention of drug residues. Kor. J. Food Hygiene, 7, S7-S19.
- Heo, G.J. and Y.M. Ko. 1996. A study on efficacy RU (*Rhizopus*) in culture Fish, *Cyprinus carpio*, *Oncorhynchus mykiss* and *Paralichthys olivaceus*. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 20, 113-119.
- Heo, J.H., M.H. Jung, M.H. Cho, G.H. Kim, K.C. Lee, J.H. Kim and T.S. Jung. 2002. The epidemiological study on fish diseases in the southern area of Kyeog-nam. J. Vet. Clin., 19, 14-18.
- Horie, M., K. Saito, N. Nose and H. Nakazawa. 1992. Simultaneous determination of quinolone antibacterials in fish and meat by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan, 33, 442-448.
- Horie, M., K. Saito, N. Nose and H. Nakazawa. 1993. Determination of enrofloxacin in meat and fish by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan, 34, 289-293.
- Horie, M., K. Saito, N. Nose and H. Nakazawa. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high performance liquid chromatography. J. Chromatogr. B, 653, 69-76.
- Horie, M., K. Saito, N. Nose and H. Nakazawa. 1995. Simultaneous determination of eight quinolone antibacterials in meat and fish by high performance liquid chromatography. J. Food Hyg. Soc. Japan, 36, 62-67.
- Jo, M.R. 2003. Determination of quinolone antibacterials and their pharmacokinetics in cultured fish. Ph.D. Thesis, Kyung-sung University, 1-112.
- Juhel, G.M. and J.P. Abjean. 1998. Screening of quinolones residues in pig muscle by planar chromatography. Chromatographia, 47, 101-104
- Kaatz, G.W., S.L. Barrier, D.R. Schaberg and R. Fekery. 1987. The emergence of resistance to ciprofloxacin during treatment of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. J. Antimicrob. Chemother., 20, 753.
- Kang, H.G., S.W. Son, H.S. Lee, J.H. Kim and M.H. Cho. 1997. Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and HPLC determination of enrofloxacin and ciprofloxacin in pork muscle tissue. Kor. J. Vet. Res., 37, 195-202.
- Leshner, G.Y., E.D. Forelich, M.D. Gruet, J.H. Bailey and R.P. Brundage. 1992. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. J. Med. Pharm. Chem., 5, 1063-1068.
- Meetschen, U. and M. Petz. 1990. Capillary gas chromatographic method for determination of benzylpenicillin and other beta-lactam antibiotics in milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 73, 373-378.
- Nagao, M., T. Tsukagara, S. Jaroenpoj and C. Ardsong-nearn. 1998. A simple analytical method for residual new quinolones in meats by HPLC. J. Food Hyg. Soc. Japan, 39, 229-332.
- Posyniak, A., J. Zumdzki, S. Semeniuk, J. Niedzielska and R. Eillis. 1999. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. Biomed. Chromatogr., 13, 279-285.
- Precorelli, I., R. Galarini, R. Bibi, A. Floridi, E. Casciarri and A. Floridi. 2003. Simultaneous determination of 13 Quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography. Anlyt. Chem. Acta, 483, 81-89.
- Seo, K.W., J.I. Lee, C.Y. Lee, E.S. Kim and J.C. Lee. 2002. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) for the isolation and liquid chromatographic determination of fluoroquinolones in eggs. Kor. J. Vet. Publ. Hlth., 26, 269-281.
- Sim, Y.H., I.C. Kim, H.O. Ku, H.G. Kang, J.M. Park and S.J. Park. 1998. Simultaneous determination of ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin in pork muscle tissue by high performance liquid chromatograph. RDA. J. Vet. Sci., 40, 50-54.
- Smither, R. 1978. Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. J. Appl. Microbiol., 45, 267-277.
- Son, S.W., E. Zomer, S.E. Charm, F.M. Clydesdale, B.H. Cho, H.S. Lee, J.M. Park, J.C. Rhee and Y.S. Lee. 1999. Paper-disk assay based on agar diffusion method for detecting quinolones in foods of animal origin. Hor. J. Vet. Publ. Hlth., 23, 251-259.
- Son, S.W. 1999. Studies on the detection of quinolones in foods of animal origin. Ph.D. Thesis, Seoul National University, 1-120.
- Wolfson, J.S. and D.C. Hooper. 1985. The fluoroquinolones: Structures, mechanisms of action and resistance, and spectra of activity in vitro. Antimicrob. Agents Chemother., 28, 1647-1650.
- 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.

---

2006년 2월 28일 접수  
2006년 4월 20일 수리