

HPLC를 이용한 우유에서의 fluoroquinolones 시험법 확립

김중화* · 홍세령 · 강태범 · 이현경¹ · 이순호²

상명대학교 화학과, ¹상명대학교 공업화학과, ²식품의약품안전청 미생물과

Establishment of an Analytical Method of Fluoroquinolones in Milk by HPLC

Jong-hwa Kim*, Se-lyung Hong, Tae-beom Kang, Hyun-kyung Lee¹, and Soon-ho Lee²

Department of Chemistry, Sangmyung University

¹Department of Industrial Chemistry, Sangmyung University

²Microbiology Division, Korea Food & Drug Administration

Abstract A high-performance liquid chromatography (HPLC) method was established for the determination of fluoroquinolones in milk. Protein was removed by using trichloroacetic acid in order to increase a mean recovery of milk. The extracts were using Strata™-X solid-phase extraction cartridge. The analytes were detected by HPLC on a C₁₈ column. HPLC method with fluorescence detection system (Ex: 278 nm, Em: 456 nm) provided a high degree of sensitivity in detecting fluoroquinolones. The limits of quantitation (LOQ) and mean recoveries of fluoroquinolones were 40 µg/kg and 73.6-95.2% (ofloxacin), 10 µg/kg and 77.3-91.9% (norfloxacin), 20 µg/kg and 91.6-94.3% (ciprofloxacin), 10 µg/kg and 81.0-87.8% (enrofloxacin), 10 µg/kg and 71.3-81.0% (sarafloxacin), 10 µg/kg and 89.4-90.8% (orbifloxacin), 2 µg/kg and 69.4-85.5% (danofloxacin).

Key words: fluoroquinolones, food, HPLC

서 론

1980년대 초에 처음 발견된 플루오르퀴놀론은 nalidixic acid의 naphthyridine 핵의 fluorine과 piperazine 환이 부착된 것이며(1), nalidixic acid보다 항균력이 강하고 항균 범위도 넓다. 이는 세균의 세포 내로 쉽게 들어가 세균의 위성이성질화 효소 중 DNA 선회효소나 위성 이성질화 효소에 작용하여 효소 활동을 저해함으로써 DNA 복사 또는 전사가 되지 않게 하여 미생물을 죽게 한다. DNA 선회효소는 그람 양성 세균에 존재하기 때문에 그람 양성 및 음성 세균 모두에 의한 질병 치료에 효과적인 광범위 항생제이다(2). 플루오르퀴놀론계 합성 항균제는 설파제 개발 이래 가장 중요한 항균 물질로써, 그람 음성 및 양성 세균과 설파제, β-lactam계, 아미노글리코사이드, 테트라사이클린, 마크로라이드 등의 항생 물질에 저항성 있는 세균에까지도 광범위하게 작용을 나타내고 있다(3). 이들은 강한 항균력을 지니고 있기 때문에 소, 개, 닭 등 가축의 질병 치료에 중요한 항균 물질로 쓰이며, 사람의 질병 치료 및 예방 약제로 널리 이용되어 왔다(4). 이런 제제들의 효능을 개선하여 2세대 퀴놀론 제제로는 ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, sarafloxacin, danofloxacin 등이 있다. 낮은 독성과 넓은 항균 범위, 경구투약 가능, 좋은 흡수력으로 인한 넓은 조직 분포로 임상에 많이 사용되고 있으며, 비뇨기과, 호흡기

계 질병에 적용하며 소화기, 피부 등의 감염에도 적용되고, 질병 예방과 세균 감염 등을 효과적으로 치료하기 때문에 여러 방면으로 그 사용이 점점 증가하고 있는 추세이다(5). 하지만, 사람이 지속적으로 플루오르퀴놀론 합성 항균제를 장기간 섭취할 경우에는 약물이 체내에 이행되어 내성균이 출현 할 수 있으며, 인체의 생리에 변화를 초래하는 등의 심각한 문제를 야기시킬 수 있다. 이러한 이유로 국제적으로는 World Health Organization(WHO)에서 플루오르퀴놀론계 합성 항균제를 사람의 질병 치료를 위한 중요한 항생제로 분류하고 있어 동물용 의약품 사용에 대한 규제의 움직임이 보이고 있다(6). 우리나라에서도 최근까지 플루오르퀴놀론 제제가 다수 동물용 의약품으로 허가되어 사용되고 있었으나 항생제 내성 등의 문제로 사람과 동물에 공통적으로 사용하고 있는 플루오르퀴놀론계 중 4종(시프로플록사신, 노르플록사신, 오픈플록사신, 페플록사신)에 대하여 국내 제조 및 수입 금지 조치를 취하여 관리하고 있고, 엔로플록사신, 사라플록사신, 오비플록사신, 다노플록사신 등은 현재 관리 대상 중에 있다. 플루오르퀴놀론계 합성 항균제 분석법에 관한 연구로는 미생물학적 방법(7,8), 면역학적 방법(9,10), HPLC를 이용한 방법(11,12) 등이 있다. 또한 최근에는 돼지고기, 소고기 등에서도 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 동시 분석법이 알려져 있다(13-15). 엔로플록사신, 시프로플록사신, 사라플록사신, 다노플록사신이 우유로 이행될 수 있다는 연구 결과가 보고된 바 있지만(16,17), 우유 내 오픈플록사신, 노르플록사신, 시프로플록사신, 엔로플록사신, 사라플록사신, 오비플록사신, 다노플록사신에 대한 감도 높은 분석법은 아직 확립되지 않았다(Fig. 1).

따라서 본 연구에서는 대표적인 소비 식품인 우유에서 안정성에 논란이 되고 있는 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 동시 분석법을 개발하기 위하여 전처리 방법 및 HPLC를 이용한 기기

*Corresponding author: Jong-hwa Kim, Department of Chemistry, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea
Tel: 82-2-2027-6294
Fax: 82-2-2027-6299
E-mail: jhkim0601@hanmail.net
Received April 13, 2010; revised May 27, 2010;
accepted June 21, 2010

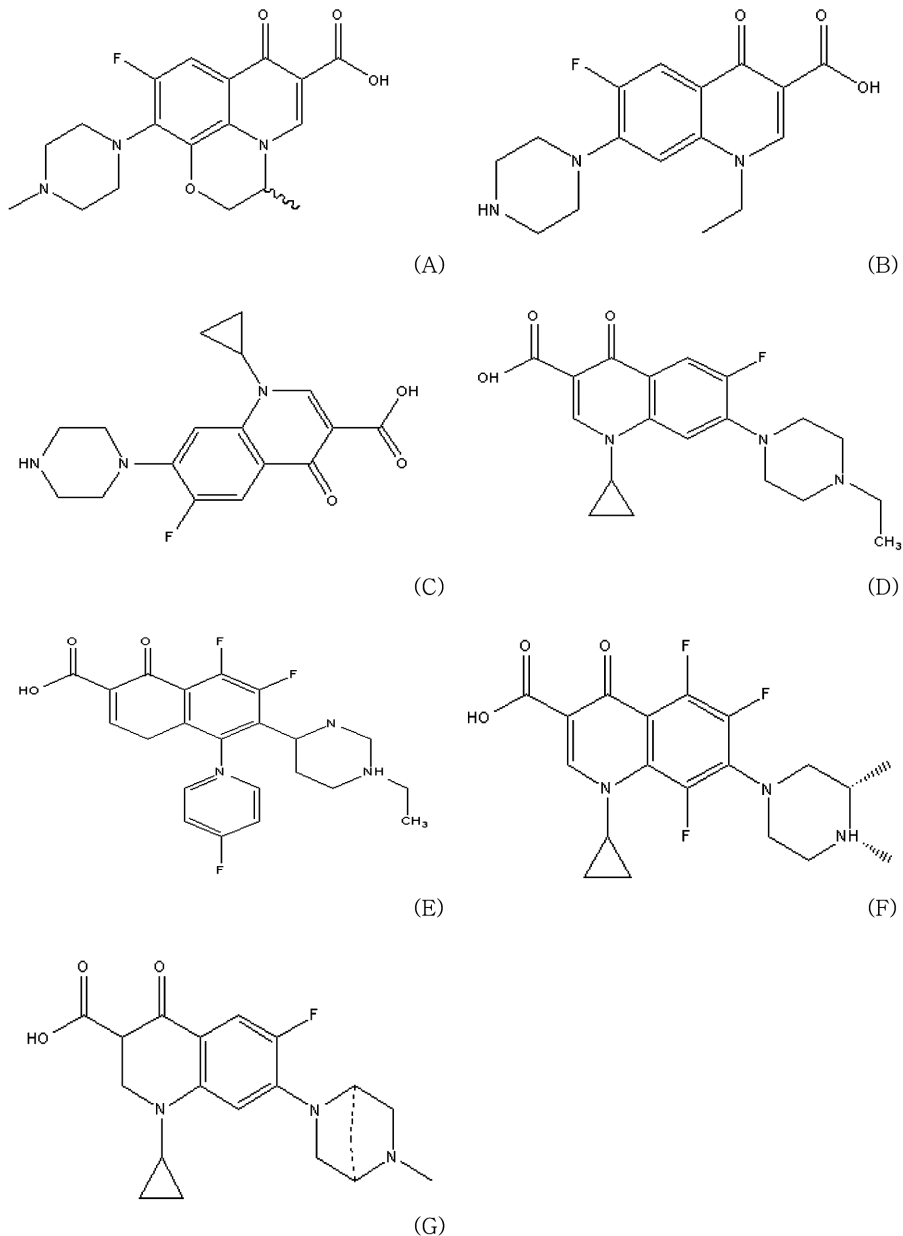


Fig. 1. Chemical structures of ofloxacin (A), norfloxacin (B), ciprofloxacin (C), enrofloxacin (D), sarafloxacin (E), orbifloxacin (F), danofloxacin (G).

분석 조건을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

분석에 사용된 ofloxacin, norfloxacin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서, ciprofloxacin hydrochloride, enrofloxacin, sarafloxacin hydrochloride은 Dr. Ehrenstorfer-GmbH(Augsburg, Germany)에서, Orbifloxacin, danofloxacin은 Riedel-de Haën(Seelize, Germany)에서 구입하였다. 추출 용매로 사용되어진 acetonitrile, methanol은 (J.T Baker, Phillipsburg, MT, USA)에서 구입하였다. Triethylamine, phosphoric acid, tetrahydrofuran, trichloroacetic acid 시약은 특급 또는 일급으로 사용하였고, 실험에 사용한 증류수는 멤브레인 필터(Millipore, Billerica, MA, USA)에서 18 M Ω -cm로 통

과시켜 사용하였다. 정제 과정에 사용되는 카트리지는 StrataTM-X (60 mg, 3 mL; Phenomenex, Torrance, CA, USA)를 사용하였다. 시료 전처리 과정 중 항생제 추출에는 원심 분리기 LS-130 (Beckman, Tokyo, Japan)를 사용하였고, Turbo vap은 ZYMARK 사(Hopkinton, MA, USA)의 제품을, Vaccum Manifolder는 VISIPREP 24TM DL(Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하였다. 본 실험에 사용한 HPLC는 Nanospace SI-2(Shiseido, Tokyo, Japan)를 사용하였고, HPLC 칼럼은 Capcell Pak C₁₈(4.6×250 mm, 5 μ m)(Shiseido)을 사용하였다. 데이터는 EZChrome Elite (Ver.3.1.3) 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

시료

우유는 국내산으로 구입하였고, 50 mL 씩 튜브에 포장하여 약 -20°C에서 냉동 보관하였다. 분석 시 실온에서 녹인 후 사용하였다.

표준검량선 작성

Ofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, orbifloxacin, danofloxacin을 각각 정밀히 달아 메탄올에 녹여 100 µg/mL가 되도록 표준원액을 제조한 후 메탄올로 희석하여 10 µg/kg의 표준용액을 제조한다. 제조된 표준원액과 표준용액은 약 2°C에서 냉장보관 하였다. 검량선 작성을 위해 표준 혼합 용액을 제조하였는데, oflaxacin은 0.02, 0.04, 0.08, 0.2, 0.4, 0.8 µg/kg가 되도록 하고, norfloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, orbifloxacin은 0.005, 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 µg/kg가 되도록 하였다. 그리고 ciprofloxacin은 0.01, 0.02, 0.04, 0.1, 0.2, 0.4 µg/kg가 되도록 하였으며, danofloxacin은 0.001, 0.002, 0.004, 0.01, 0.02, 0.04 µg/kg가 되도록 하였다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 확인하였는데, 7종의 플루오르퀴놀론을 validation 한 결과 같은 머무름 시간에 분석되었다. 이후 크로마토그램으로부터 얻은 피크의 머무름 시간을 확인하고, HPLC로 분석하여 얻은 크로마토그램으로부터 각각의 플루오르퀴놀론계에 대한 농도별 평균면적을 구하고 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 검량선을 작성하였다.

우유 시료 중의 플루오르퀴놀론계 추출

균질화한 시료 1 g을 무게를 정확히 측정하여 15 mL 원심 분리관에 취하고, 10% trichloroacetic acid와 acetonitrile(9:1, v/v) 5 mL를 첨가한 후 5분 동안 균질화 하였다. 4°C, 3000 rpm에서 6분간 원심 분리하여 상등액을 새로운 원심 분리관에 취하고, 이 과정을 한 번 더 반복한다.

Strata™-X 카트리지를 사용한 정제

우유의 추출용액을 미리 메탄올 3 mL, 물 3 mL로 활성화시킨 SPE-Surface modified polymer reversed phase(Strata™-X) 카트리지(충진제 60 mg, 3 mL)에 흡착시키고 10% 메탄올 수용액 3 mL로 세척한 후 메탄올 3 mL로 용출하였다. 용출액은 40°C에서 질소농축하고 잔류물은 0.4% triethylamine, 0.4% phosphoric acid (1:1, v/v)과 acetonitrile, tetrahydrofuran(97.5:2.5, v/v) (91:9, v/v) 1 mL에 녹인 후 PTFE 0.2 µm 멤브레인 필터(Millipore)로 여과하여 HPLC로 분석하였다.

Table 1. Analytical conditions of HPLC for analysis of fluoroquinolones

Parameters	Conditions		
Column	Capcell Pak C ₁₈ (4.6×250 mm, 5 µm)		
Column Temp.	40°C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 µL		
Run time	55 min.		
Gradient	Time (min)	% A (1)	% B (1)
	init	91.0	9.0
	25	91.0	9.0
	26	88.0	12.0
	38	88.0	12.0
	40	85.0	15.0
	46	85.0	15.0
47	91.0	9.0	
Wavelength	Ex (nm) 278, Em (nm) 456		

(1) A: 0.4% triethylamine, 0.4% phosphoric acid (1:1, v/v)
B: acetonitrile, tetrahydrofuran (97.5:2.5, v/v)

HPLC에 의한 분석

플루오르퀴놀론계의 분석의 HPLC 조건은 Table 1에 요약되어 있다(Table 1). 분석칼럼은 Shiseido Capcell Pak C₁₈(4.6×250 mm, 5 µm)의 역상칼럼을 이용하였고, 이동상 A는 0.4% triethylamine과 0.4% phosphoric acid(1:1, v/v)을, 이동상 B는 acetonitrile과 tetrahydrofuran (97.5:2.5, v/v)을 이용하였다. 분석시간 0분에서 25분까지 이동상 A 91%로 용리하고, 25분에서 38분까지 linear gradient로 B가 12%가 되도록 한 다음 46분까지 15%로 이동상 B를 유지하면서 1.0 mL/min의 유속으로 분석을 실시하였다. 분석칼럼의 오븐 온도는 40°C로 일정하게 하였다.

분석법 검증

우유 시료에 대하여 7종의 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 농도별 회수율을 구하기 위하여 플루오르퀴놀론계 혼합 용액을 각각 LOQ×1, LOQ×2.5, LOQ×5의 농도가 되게 시료에 첨가한 후, 일 내(Intra-day) 5회 반복 실험하여 재현성과 정밀성을 구하고, 2 일간(Inter-day) 반복 수행하여 일간 재현성을 보았다.

결과 및 고찰

우유에 잔류하고 있는 7종의 플루오르퀴놀론계 합성 항균제를 분석하기 위해 HPLC를 사용하였다.

플루오르퀴놀론계는 Fig. 1과 같이 구조적으로 fluorine기를 가지고 있기 때문에 HPLC 분석 시, UV 검출기보다 형광 검출기를 사용 할 때 특이성과 민감성 있는 결과를 보여주었고, Ex: 278 nm, Em: 456 nm에서 최적 파장을 보여주었다(18). 기존의 분석 방법(19)을 살펴보면 계란에서 4종의 플루오르퀴놀론 약물을 연구한 결과 peak tailing이 문제가 된 바 있다. 플루오르퀴놀론계는 분자 구조상 산성과 염기성의 작용기를 모두 가지고 있어서 HPLC

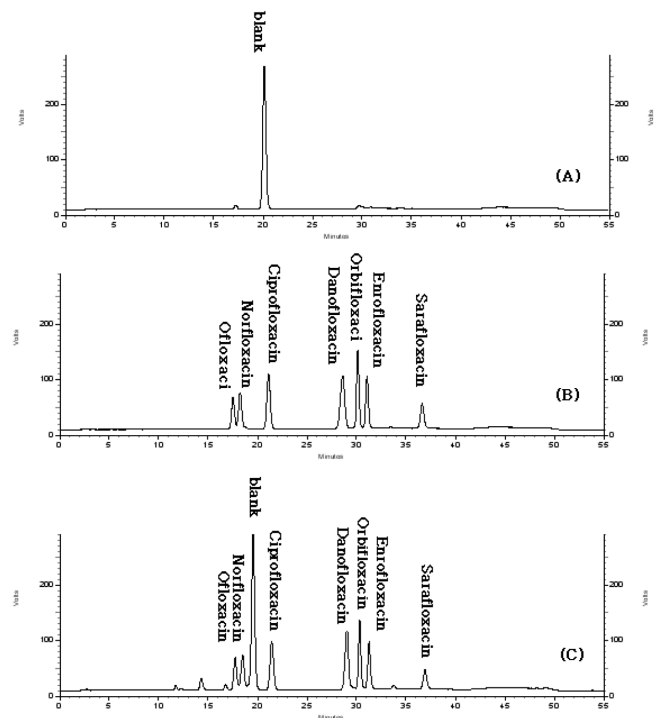


Fig. 2. Chromatograms of fluoroquinolones in blank sample (A), standard solution (B), and milk fortified with various fluoroquinolones.

컬럼으로 사용된 C_{18} 컬럼의 고정상에 있는 free silanol과 결합하여 분석 시 약간의 끌림 현상이 나타난다고 한다. 이러한 이유로 이동상에 트리에틸아민과 인산을 첨가하여 약간의 끌림 현상을 방지하였다(20).

Fig. 2(A)는 우유의 blank 시료이고, Fig. 2(B)는 플루오르퀴놀론계 각 성분의 표준물질, Fig. 2(C)는 시료에 7종의 플루오르퀴놀론을 첨가한 시료로서 본 시험방법에 따라 전처리 한 후 HPLC로 분석하여 얻은 대표적인 크로마토그램이다. Fig. 2(A)에서 보면 blank 시료에서 약 20분대에 피크가 검출되었지만 이것은 우유 시료에서 나온 피크로 각각의 플루오르퀴놀론계의 성분들과 겹치지 않았고, Fig. 2(B)의 7종의 플루오르퀴놀론의 피크는 약 17-40분대에서 모두 검출되며, 원하는 물질을 선택성 있게 분석할 수 있는 것으로 확인되었다(Fig. 2).

우유 시료에 잔류되어 있는 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 추출율을 높이기 위하여 삼염화초산을 사용하여 우유 내 단백질을 제거하였고, 추출 방법을 최소화하여 분석 시간을 최소한 단축하였다. 플루오르퀴놀론계를 아세트오니트릴, 에탄올 또는 메탄올과 같은 극성 용매에 10% 삼염화초산을 혼합하여 회수율을 살

Table 2. Recoveries of fluoroquinolones from different type

Antibiotics	Concentration ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Cartridge (n=5)	
		Strata™-X(%)	C_{18} (%)
Ofloxacin	200	95±8	130±10
Norfloxacin	50	75±2	124±3
Ciprofloxacin	100	92±8	58±8
Enrofloxacin	50	90±1	62±6
Sarafloxacin	50	81±9	43±9
Orbifloxacin	50	90±2	62±7
Danofloxacin	10	86±5	56±8

펴 본 결과, 에탄올을 사용하였을 때 99-210%, 메탄올을 사용하였을 때 32-94%, 아세트오니트릴을 사용하였을 때 81-94%로 아세트오니트릴을 사용하였을 때가 좋은 결과를 나타내어 아세트오니트릴에 10% 삼염화초산을 혼합 한 추출 용매를 사용하였다. 또한 정제를 위하여 기존의 분석 방법(21)을 살펴보면 C_{18} 카트리지를 사용하여 다종의 플루오르퀴놀론을 분석하였지만, 본 연구에서는

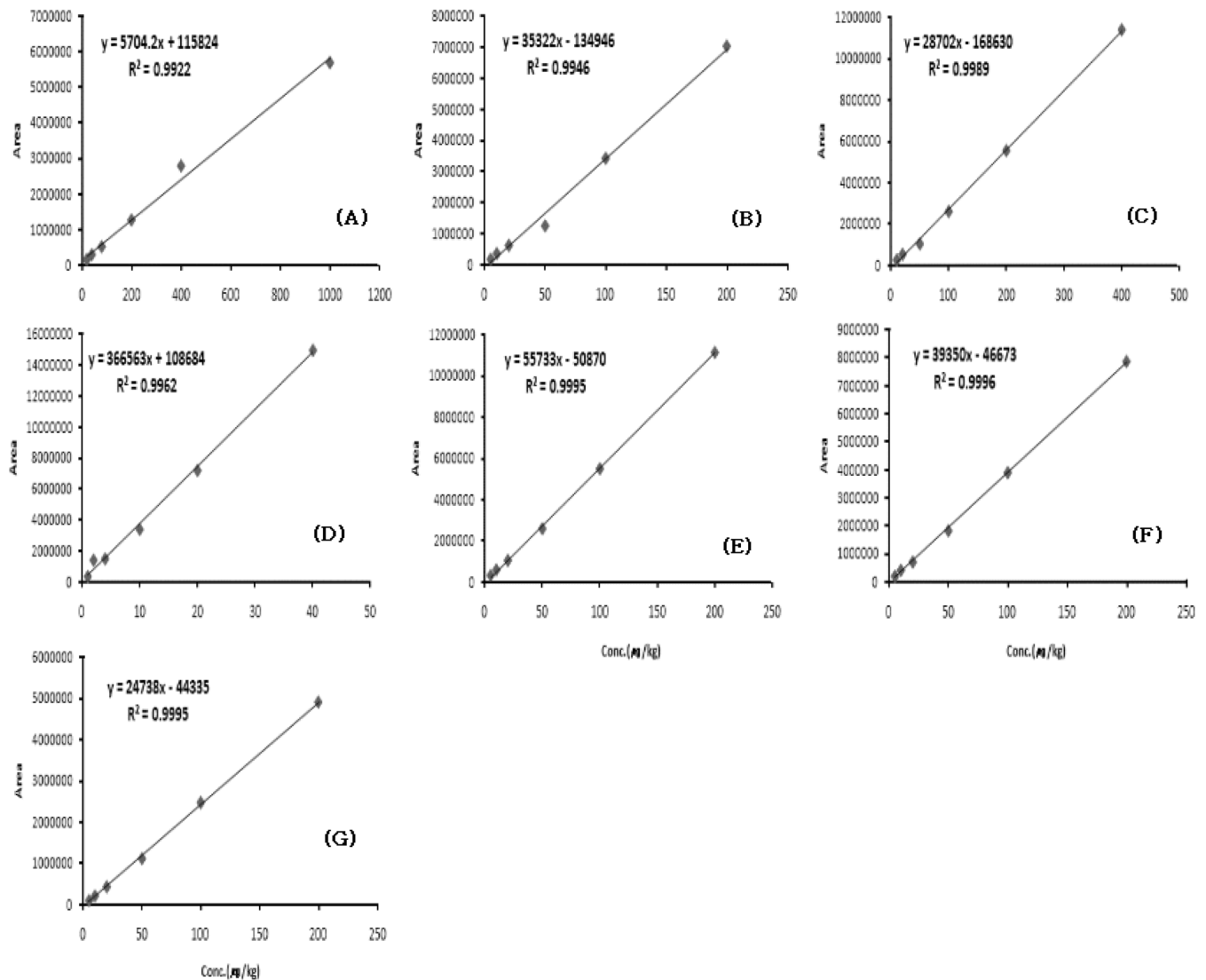


Fig. 3. Standard curves for ofloxacin (A), norfloxacin (B), ciprofloxacin (C), enrofloxacin (D), sarafloxacin (E), orbifloxacin (F), and danofloxacin (G).

Table 3. Recoveries of fluoroquinolones in milk using HPLC

Compound	Intra-day			Inter-day	
	Spiked (mg/kg)	Recovery (%)	CV(%)	Recovery	CV(%)
Ofloxacin	0.04	77.0±5.5	7.2	73.6±7.7	10.4
	0.1	88.9±7.6	8.5	91.4±6.1	6.7
	0.2	101.7±14.5	14.2	95.2±13.1	13.7
Norfloxacin	0.01	92.0±4.4	4.7	91.9±6.5	7.1
	0.025	83.5±4.0	4.8	80.9±4.0	5.0
	0.05	83.5±9.7	11.6	77.3±9.6	12.4
Ciprofloxacin	0.02	99.3±4.4	4.4	94.3±7.0	7.4
	0.05	93.5±5.0	5.3	91.6±4.6	5.1
	0.1	96.6±12.4	12.8	91.8±10.2	11.1
Enrofloxacin	0.01	83.7±5.02	6.0	81.0±7.0	8.6
	0.025	85.4±6.2	7.2	84.5±4.7	5.6
	0.05	92.5±13.7	14.8	87.8±10.8	12.3
Sarafloxacin	0.01	76.2±3.3	4.3	71.3±6.4	9.0
	0.025	75.8±9.0	11.9	74.4±7.6	10.3
	0.05	88.5±7.1	8.0	81.0±9.6	11.8
Orbifloxacin	0.01	91.3±5.6	6.1	89.4±6.8	7.6
	0.025	92.8±5.3	5.7	90.0±5.4	6.0
	0.05	93.4±11.4	12.2	90.8±11.6	12.8
Danofloxacin	0.002	63.4±5.8	8.4	69.4±6.8	9.7
	0.005	78.6±5.7	7.2	81.0±5.1	6.3
	0.01	86.0±14.3	14.6	85.5±10.3	12.0

7종 모두의 회수율을 동시에 높이기 위하여 극성, 비극성을 모두 분석할 수 있는 SPE-Surface modified polymer reversed phase (Strata™-X, Phenomenex) 카트리지를 선택하였다(Table 2).

정량한계(limit of quantitation, LOQ)는 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)를 10 이상으로 한 농도를 LOQ로 정하였으며, ofloxacin 40 µg/kg, norfloxacin 10 µg/kg, ciprofloxacin 20 µg/kg, enrofloxacin 10 µg/kg, sarafloxacin 10 µg/kg, orbifloxacin 10 µg/kg, danofloxacin 2 µg/kg이었다.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 상관계수 r^2 은 ofloxacin 0.9922, norfloxacin 0.9946, ciprofloxacin 0.9989, enrofloxacin 0.9962, sarafloxacin 0.9995, orbifloxacin 0.9996, danofloxacin 0.9995으로 Codex(국제식품규격위원회)에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$ 과 비교해도 매우 만족할 만한 수준이었다(Fig. 3).

우유 시료에 대하여 7종의 플루오르퀴놀론계 합성항균제의 농도별 회수율을 구하기 위하여 플루오르퀴놀론계 혼합 용액을 각각 LOQ×1, LOQ×2.5, LOQ×5의 농도가 되게 시료에 첨가한 후, 일 내(Intra-day) 각 성분의 농도마다 5회 반복 실험하여 재현성과 정밀성을 구하고, 2일간(Inter-day) 반복 수행하여 일간 재현성을 보였으며, 회수율의 결과를 Table 3에 나타내었다(Table 3).

Table 3에서 보면 우유에서의 ciprofloxacin, enrofloxacin, orbifloxacin 물질들의 회수율은 각 농도 범위에서 81.0-94.3%, 상대 표준편차/평균×100으로 정밀성(Coefficient of variation, C.V., %)을 구한 결과 각각 5.1-12.8%로 높은 회수율을 보이는 반면, ofloxacin, norfloxacin, sarafloxacin, danofloxacin 물질들의 회수율은 각 농도 범위에서 69.4-95.2%, 정밀성은 각각 5.0-13.7%로 다소 낮은 회수율을 보이는 정도 있었지만, 이것은 Codex 권장 수준 이내에 만족할만한 결과를 보였다. 따라서 본 연구의 HPLC 분

석법은 우유 내 잔류하고 있는 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 정량과 확인에 이용될 수 있는 충분한 감도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있다고 사료된다.

결론

본 연구에서는 우유에서의 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 회수율을 높이기 위하여 삼염화초산을 사용하여 우유 내 단백질을 제거하였고, 아세토니트릴을 추출용매로 사용하였다. 또한 정제를 위하여 극성, 비극성을 모두 분석할 수 있는 SPE-Surface modified polymer reversed phase(Strata™-X, Phenomenex) 카트리지를 사용하였다. HPLC를 사용하여 플루오르퀴놀론계 합성 항균제를 정량 분석하였는데 구조적으로 fluorine기를 가지고 있기 때문에 형광 검출기를 사용하였고, Ex: 278 nm, Em: 456 nm에서 높은 감도를 보였다. 플루오르퀴놀론계 합성항균제의 정량한계와 회수율을 측정된 결과 ofloxacin 40 µg/kg, 73.6-95.2%, norfloxacin 10 µg/kg, 77.3-91.9%, ciprofloxacin 2 µg/kg, 91.6-94.3%, enrofloxacin 10 µg/kg, 81.0-87.8%, sarafloxacin 10 µg/kg, 71.3-81.0%, orbifloxacin 10 µg/kg, 89.4-90.8%, danofloxacin 2 µg/kg, 69.4-85.5%이었다. 또한 그래디언트 조건을 사용하여 적당한 분석 시간과 양호한 피크모양도 얻을 수 있었고, HPLC를 사용하여 시료 내 잔류되어 있는 7종의 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 성분들을 동시에 검출할 수 있는 확인 정량법이라고 판단된다.

따라서 본 연구에서 개발된 분석법은 최근 식품 내 플루오르퀴놀론계 합성항균제의 잔류 여부로 논란의 대상이 되고 있는 시유 제품에 매우 유용하게 적용할 수 있으리라 사료된다.

요 약

본 연구에서는 우유에서 플루오르퀴놀론계 합성 항균제의 확인과 정량을 위하여 HPLC를 이용한 방법을 개발하였다. 우유 내 단백질을 제거하기 위하여 삼염화초산을 사용하였고 아세트니트릴로 추출하였다. 그리고 Strata™-X 카트리지로 정제한 후 C₁₈ 칼럼을 이용한 HPLC로 분석하였다. 높은 감도를 얻기 위하여 형광 검출기를 사용하였고, 최적파장 Ex: 278 nm, Em: 456 nm에서 분석한 결과 우유 내에서 정량한계와 회수율은 각각 ofloxacin 40 µg/kg, 73.6-95.2%, norfloxacin 10 µg/kg, 77.3-91.9%, ciprofloxacin 20 µg/kg, 91.6-94.3%, enrofloxacin 10 µg/kg, 81.0-87.8%, sarafloxacin 10 µg/kg, 71.3-81.0%, orbifloxacin 10 µg/kg, 89.4-90.8%, danofloxacin 2 µg/kg, 69.4-85.5%이었다.

문 헌

1. Wolfson JS, Hooper DC. Fluoroquinolones antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 2: 378-424 (1989)
2. Gellert M. DNA topoisomerase. Annu. Rev. Biochem. 50: 879-910 (1981)
3. Posyniak A, Zmudzki J, Semeniuk S, Niedzielska J, Ellis R. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. Biomed. Chromatogr. 13: 279-285 (1999)
4. Eliopoulos GM, Liopoulos CT. Activity *in vitro* of the quinolones. Am. Soc. Microbiol. Washington. 2nd: 161-193 (1993)
5. Goldstein EJC, Citron DM, Gerardo SH, Hudspeth M, Merriam CV. Comparative *in vitro* activities of DU-6859a, levofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against 387 aerobic and anaerobic bite wound isolates. Antimicrob. Agents Ch. 41: 1193-1195 (1997)
6. Food and Agriculture Organization. Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance. Available from: ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13. Accessed Aug.25,2008.
7. Bogaerts R, Brussels FW. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. Fleischwirtschaft 60: 672-673 (1980)
8. Drlica K, Zhao X. DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. Microbiol. Mol. Biol. R. 61: 377-392 (1997)
9. Son SW. Studies on the detection of quinolones in foods of animal origin. PhD thesis, Seoul National University, Seoul, Korea (1999)
10. Watanabe H, Satake A, Yasumasa K, Akio T. Monoclonal based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. Analyst 127: 98-103 (2002)
11. Carlucci G. Analysis of fluoroquinolones in biological fluids by high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 812: 343-367 (1998)
12. Schneider MJ, Donoghue DJ. Multiresidue determination of fluoroquinolones in eggs. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 83: 1306-1312 (2000)
13. Yorke JC, Froc P. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. J. Chromatogr. A 882: 63-77 (2000)
14. Zhao SJ, Li C, Jiang HY, Li BY, Shen JZ. Simultaneous determination of 7 quinolones residues in animal muscle tissues by high performance liquid chromatography Chinese. J. Anal. Chem. 35: 786-790 (2007)
15. Eleni AC, Victoria FS, Ioannis NP. Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. J. Chromatogr. B 859: 246-255 (2007)
16. Roybol JE, Pxenning AP, Turnipseed SB, Walker CC, Hurlbut JA. Determination of four fluoroquinolones in milk by liquid chromatography. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 80: 982-987 (1997)
17. Guixiang Y, Baoyin L, Zhenling Z, Zhangliu C, Xianhui H. Multiresidue determination of eleven quinolones in milk by liquid chromatography with fluorescence detection. J. Assoc. Off. Ana. Chem. 88: 1688-1694 (2005)
18. Seo KW. Studies on the residues of fluoroquinolones in chicken egg. PhD thesis, Chonnam University, Gwangju, Korea (2000)
19. Seo KW, Lee JI. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) for the isolation and LC determination of fluoroquinolones in eggs. J. Vet. Publ. Hlth. 26: 261-281 (2002)
20. Kung K, Riord JL, Wanner M. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dog. J. Vet. Pharmacol. Ther. 16: 442-468 (1993)
21. Gigosos PG, Revesado PR, Cadahia O, Fente CA, Vazquez BI, Franco CM, Cepeda A. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. J. Chromatogr. A 871: 31-36 (2000)