

조피볼락에서 Pefloxacin의 미분쇄가 약물동력학 Parameters에 미치는 영향

임영근 · 양영환 · 김진우* · 손상규* · 심경희 · 김유정 · 정한영 · 최우식 · 야마모토 케이지** · 정해영[†]

부산대학교 약학대학

*국립부산수산진흥원

**일본 지바대학교 약학부

Effects of Pefloxacin Grinding on Pharmacokinetic Parameter in Korean Rockfish

Young-Keun Im, Young-Whan Yang, Jin-Woo Kim*, Sang-Gyu Sohn*, Kyung-Hee Shim, You-Jung Kim,
Han-Young Chung, Woo-Sik Choi, Keiji Yamamoto** and Hae-Young Chung[†]

College of Pharmacy, Pusan National University

**National Fisheries Research and Development Institute, Pusan, Korea*

***Faculty of Pharmaceutical Science, Chiba University, Chiba, Japan*

Abstract

Antibiotics have been routinely used to control the disease of farm-raised animals in the aquaculture facilities without any criterion based on a pharmacokinetic study. This lack of information on the effective usage of antibiotics would have brought the farmers to use excessive and/or less dosages, causing the advent of drug-resistant bacteria as well as economic loss and possible contamination of the local farming area.

Until recently, few studies on a detailed manual for the antibiotic usage including chemotherapy procedure, dosage, and treatment schedule of the aquatic antibiotics have been conducted throughout the world. To the worse, there is no available criterion for optimal usage of aquatic antibiotics to control diseases in aquatic farms in this country because every country has its own aquacultural system. Therefore, based on the previous studies on the usage of the various antibiotics, our studies are to focus on the development of optimal method for the detection of various antibiotics on the fate of antibiotics applied to the fish, including absorption, circulation, and secretion physiology.

Pharmacokinetic study were to set up the optimal detective condition against residual antibiotics of fish by HPLC. The grinding pefloxacin for 15 min is most effective in dissolution test and pharmacokinetic parameters.

Pharmacokinetic parameters were satisfactory for 15 min-grinding products and they can be explained as one-compartment model.

Key words – Pefloxacin, Pharmacokinetic parameter, Rockfish

[†] Corresponding author

서 론

최근 들어 사육밀도의 증가, 해저 유기물의 축적과 산업폐수 및 생활하수에 의한 사육수질의 악화로 각종 질병에 대한 양식어류 항병력이 저하되어, 치료와 예방기술이 양식장의 사육관리의 핵심분야로 대두되고 있다. 이러한 수산용 약제의 과다한 사용에 따라 용법, 용량 및 출하전 휴약기간 등 구체적인 사용지침이 필요하지만 외국에서도 수산용 약제에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않다. 항생물질의 남용은 어류 질병을 일으키는 세균에 있어서 그 내성을 증가시켜 어병에 의한 경제적 손실과 항균제의 효력감소는 물론, 공중위생학상 크게 문제시 되고 있다. 또한, 어류 체내에서 항균물질의 최적 검출기법을 확립하고, 약물(항균제)의 입자 크기를 제어하여 속효성 항균제의 제형 개발과 약제의 어체 내에서의 흡수, 순환, 배설생리를 밝혀 경제적·환경적 차원에서 여러 가지 문제점을 보완하는 연구가 시급한 실정이다.

난용성 의약품을 제제화하기 위하여는 입자경을 작게 하여 생체이용율(bioavailability)의 향상과 동시에 또한 제제의 혼합성·분산성을 좋게 하기 위한 미분쇄 조작을 필요로 한다[21]. 이는 체액내에서 미분에 의한 표면적의 증대가 용해성의 개선에 크게 도움이 되기 때문이다. 현재 시판되고 있는 대부분의 항생제는 입도의 물성 및 제제설계 등을 전혀 고려하지 않은 상태에서 무분별하게 조제·남용되고 있는 실정이며, 이로 인해 전술한 바의 여러 가지 문제점들을 가중시키는 결과를 초래하고 있다. 이러한 항균제의 문제점을 보완하기 위해서는 입자 설계에 의한 난용성 항생제의 어체 내에서의 배설속도를 제어하는 속효성 제형 개발이 선행되어야 한다.

한편, 식품 중의 항균물질을 검사하는 방법으로는 미생물학적 검사방법과 HPLC, GC/mass 등의 분석장비를 사용한 기기분석학적 검사방법[16]이 있으며, 최근들어 RIA, ELISA와 같은 면역학적 분석법[14]의 연구가 활발히 연구되고 있다. High performance liquid chromatography (HPLC)는 가급류 등의 체내에 잔류하는 항균물질을 정량하기 위해 현재까지 꾸준히 연구되어 왔으며[4,17,20], 최근 어류의 경우에 있어서도 간단한 분석법 개발을 위한 연구가 활발히 진행되고 있다[15,18].

본 실험에서는 양식어류에 사용되는 항생물질 중에서

난용성 항균제로 알려진fluoroquinolone계인 pefloxacin을 실험재료로 선정하였다. Pefloxacin은 유백색의 결정성 분말의 항생물질[9]로서(Fig. 1), 원핵세포에만 존재하는 DNA gyrase를 불활성화하여 미생물의 핵산합성을 저해하는 살균적 작용을 갖는 항균물질이다[2]. Pefloxacin은 광범위한 항균범위를 가지며 특히 그람음성균에 대해 높은 항균력을 가져, 그람음성균이 대부분인 어병세균에 탁월한 효과를 나타내리라 생각된다[7,8,13].

본 연구자는 상술한 pefloxacin에 대해 약물동태학적 연구 보고된 검출기법을 토대로 실험조건의 특이성 등을 검토하여 수산용 의약품에 적용시켜 최적 분석 조건을 설정하고[22], 이에 대하여 유성불밀을 사용한 분쇄조작[5, 6]에 의한 물성의 변화 및 이와 관련되어진 어체 내에서의 흡수와 소실속도 등을 기기분석법(HPLC)으로 조사하여 약물동태학적 연구를 수행하고자 하였다.

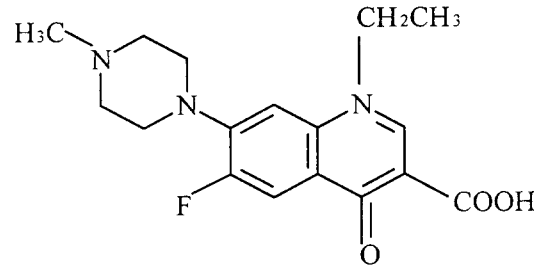


Fig. 1. Chemical structure of pefloxacin

재료 및 방법

표준시약의 조제

건식법에 의한 유성불밀[5,6]을 사용하여 분쇄시간 15분, 30분 및 60분간 분쇄하여 얻은 pefloxacin 분쇄품을 HPLC를 이용한 회수율과 어체 내에서의 약물동력학에 관한 연구를 위한 시료로 사용하였다.

HPLC 측정

Pefloxacin 표준품과 분쇄품의 용해도 측정 및 어체내 혈중농도의 변화를 관찰하기 위하여 HPLC로 측정하였다[1,9]. HPLC의 기종은 GILSON 712 system으로 이동상은 water, acetonitrile 및 methanol 용액을 700:200:100

(v/v/v)의 비율로 혼합한 후 이 용매에 phosphoric acid와 triethylamine 용액을 각각 4 ml 씩 첨가한 혼합용매를 사용하였다. UV detector를 이용하여 검출과장 278 nm에서 측정감도 0.002 Absorbance Unit Full Scale(AUFS)로 설정한 후, 이동상의 유속을 1.0 ml/min 으로 유지하면서, auto-sampler를 이용하여 sample의 injection 양을 20 µl 로 하여 COSMOSIL(C₁₈, 5 µm, 4.6×150 mm) column을 이용하여 분석하였다.

Pefloxacin은 표준품과 분쇄 시간(15, 30 및 60 분)에 따른 미분쇄품 각각을 1 mg 씩을 취하여 5 ml의 0.1N-NaOH 용액으로 용해(200 ppm)하여 갈색시약병에 넣어 4 °C에서 보관하여 사용하였다. Stock solution 500 µl를 test tube에 취하고 동량의 증류수를 가하여 1 ml(100 ppm)로 맞추는 다음, 이 용액을 mobile phase로 희석하여 working solution으로 사용하였다.

실험어 및 항균제의 투여

질병에 감염되지 않고 항균제 투여치료를 받은적이 없는 건강한 조피볼락을 수조로 옮겨 10 일간 순치시킨 후 실험에 사용하였으며, HPLC 분석용 시료어(조피볼락)는 당년생의 체중 450±20 g을 사용하였으며, pefloxacin 표준품과 미분쇄된 3종의 pefloxacin에는 각각 20 mg/kg · 어 체중을 사료에 혼합하여 강제 경구투여한 후 미량잔류농도를 측정하기 위하여 시간별로 혈액을 0.8~1.0 ml씩 채취하여 HPLC의 측정방법에 의하여 혈중 농도를 측정하였다[11,12]. 실험어의 사육수온은 20±1.5°C로 하였다.

어체내 혈중농도의 변화 측정

HPLC를 이용하여 혈중 및 각 조직에서의 pefloxacin 표준품과 미분쇄품 3종의 pefloxacin의 측정조건과 회수율을 검토하기 위하여 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 sample을 전처리하였다. 약물을 투여하지 않은 정상적인 조피볼락의 간, 근육, 비장, 신장 및 혈청 1 g(ml)을 취하여 증류수 1 ml를 가한 다음 homogenizer로 균질화 한 후, 얻어진 각각의 조직 균질액 50 µl에 pefloxacin 표준품 각 농도에서(각각 10, 1.0 및 0.1 ppm)의 용액을 50 µl를 가하고, 100 µl 0.1N-NaOH 용액을 가하여 10 분간 방치하였다. 이것을 10,000 rpm, 20 분간 원심분리하여 상등액을 여과(pore size 0.45 µm)한 후 HPLC로 측정하여 회수율을

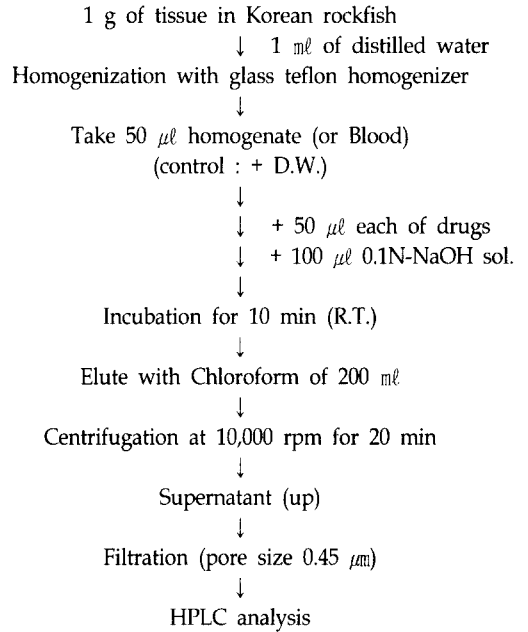


Fig. 2. The procedure of experiment for pefloxacin yields in Korean rockfish

구하였다. 대조군은 각조직의 균질액 및 혈청 대신에 증류수를 사용하였다.

Fig. 3는 pefloxacin 표준품과 미분쇄품 3종의 pefloxacin을 경구 투여한 조피볼락에서 시간별로 취한 혈액의 전처리 과정이다. 혈청을 200 µl 취하여 동량의 100 µl 0.1N-NaOH 용액을 가하고 voltex하여 10 분간 방치한 후 10,000 rpm, 20 분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 얻어진 상등액은 filtration(pore size 0.45 µm)하여 HPLC로 각 항생제의 최적 분석조건에서 그 농도를 측정하였다.

결과 및 고찰

용해도 측정 결과

Pefloxacin 표준품과 15, 30 및 60 분간 분쇄하여 얻어진 각각의 분쇄품의 용해도와의 관계를 알아보기 위해 실험한 용해도 측정 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Pefloxacin에 표준품에 비해서 분쇄를 하였을 경우 용해도가 개선됨을 알 수 있었으며, 15 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서 가장 양호한 용해도 곡선을 얻을 수 있었다. 즉, 난용성

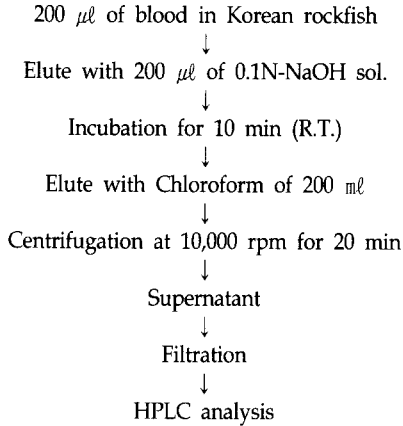


Fig. 3. Extraction procedure of pefloxacin in blood of Korean rockfish

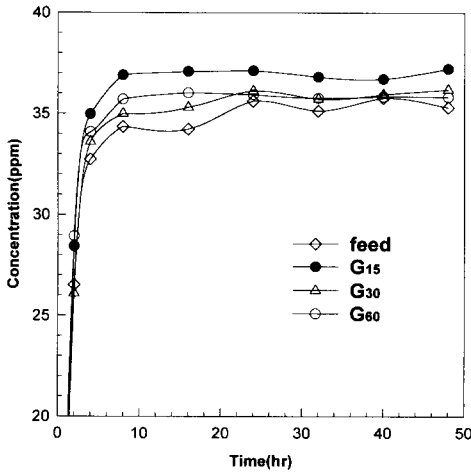


Fig. 4. Effect of grinding on dissolution of pefloxacin in water at 20°C.

Feed ; before grinding, Grinding time : G₁₅ ; 15 min, G₃₀ ; 30 min, G₆₀ ; 60 min

물질(pefloxacin)은 분쇄라는 조작에 의해 입도가 작아지고, 비표면적의 증가로 인한 그 물리적인 특성중의 하나인 용해도가 개선되므로 속효성 제형으로의 전환이 가능함을 시사하고 있다[10,21].

검량곡선 및 회수율 측정

Pefloxacin이 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 및

0.19 ppm 함유된 표준시액을 HPLC에 injection 하였을 때 그 각각의 농도에 비례하는 peak값을 얻을수 있었다. Fig. 5 에서 나타낸 바와 같이 pefloxacin의 각 농도에 대한 검량선이 대체로 양호한 직선성($y=1.0026 \times 10^5 x - 6.1 \times 10^5$, $R^2=0.9989$)을 나타내었다.

Pefloxacin 0.01, 0.1, 1.0 및 10 ppm 의 표준용액을 조피블락의 간, 근육, 비장, 신장 및 혈액 중에 가한 다음 0.1N-NaOH 용액으로 각 농도에서의 항균제를 추출하여 그 회수율을 조사한 결과 Table 1 에서와 같이 10, 1.0, 0.1, 0.01 ppm 에서의 농도변화에 따른 조피블락의 각 장기별 회수율은 평균적으로 82%로 나타났다. 특히 혈액중에서 10, 1.0, 0.1, 0.01 ppm 에서의 회수율은 각각 78.72 ± 0.99 , 75.53 ± 3.46 , 82.21 ± 4.83 및 $81.04 \pm 5.33\%$ 로 다소 낮은 수치를 나타내었으나, chloroform으로 진탕한 후 methylene chloride 를 가해서 추출 정제한 방법에 비하여 대단히 간단하고, 회수율도 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다 [11,12].

어체내 잔류농도 측정

Pefloxacin 의 표준품과 분쇄 시간(15, 30 및 60분)에 따른 분쇄품을 조피블락에 강제 경구 투여한 후, 혈중농도의 측정 결과는 Fig. 6에 나타내었다. 표준품의 경우에 있어서의 체내 배설 속도를 보면 약물 투여후 2 시간에서 5.45

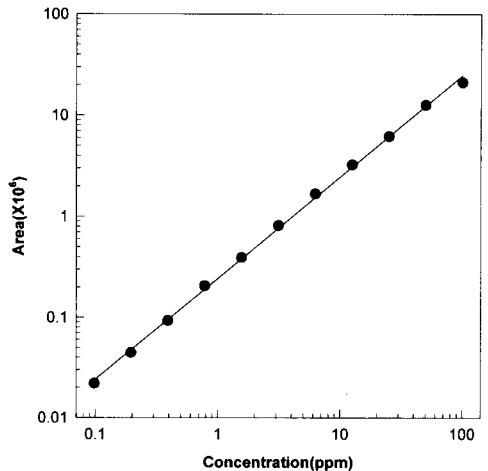


Fig. 5. Calibration curve of pefloxacin in HPLC assay. $y=1.0026 \times 10^5 x - 6.1 \times 10^5$, $R^2=0.9989$

Table 1. Recovery of pefloxacin from tissue of Korean rockfish

Tissue	Concentration (ppm)	Re ¹⁾ /Co ²⁾	Recovery(%)
Liver	10.0	0.82 ± 0.05	82.11 ± 4.63
	1.0	0.80 ± 0.02	79.60 ± 1.98
	0.1	0.83 ± 0.05	82.55 ± 5.42
	0.01	0.88 ± 0.08	87.88 ± 7.69
Muscle	10.0	0.81 ± 0.05	81.23 ± 5.11
	1.0	0.81 ± 0.02	81.13 ± 2.03
	0.1	0.82 ± 0.02	82.25 ± 2.06
	0.01	0.86 ± 0.02	86.02 ± 1.61
Spleen	10.0	0.82 ± 0.03	82.32 ± 2.99
	1.0	0.80 ± 0.03	79.89 ± 2.64
	0.1	0.86 ± 0.02	85.51 ± 1.98
	0.01	0.99 ± 0.01	99.40 ± 1.12
Kidney	10.0	0.88 ± 0.01	87.56 ± 1.48
	1.0	0.81 ± 0.07	81.30 ± 7.33
	0.1	0.89 ± 0.05	89.26 ± 5.44
	0.01	0.91 ± 0.03	90.99 ± 3.26
Blood	10.0	0.79 ± 0.01	78.72 ± 0.99
	1.0	0.76 ± 0.03	75.53 ± 3.46
	0.1	0.82 ± 0.05	82.21 ± 4.83
	0.01	0.81 ± 0.05	81.04 ± 5.33

1) Recovered peak area, 2) Control peak area.

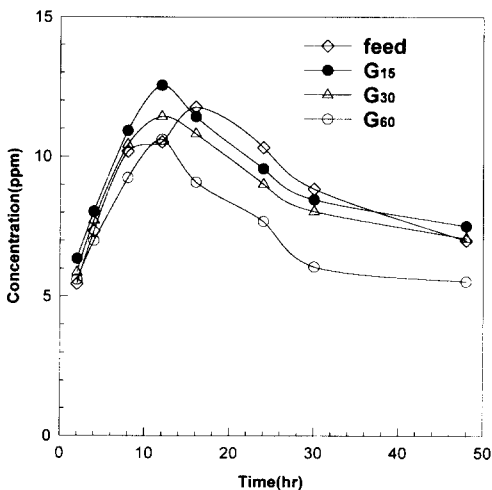


Fig. 6. Effects of grinding on blood levels of pefloxacin Korean rockfish after administration at a dose 20 mg/kg.

μg/ml 의 혈중 농도를 보이다가 점차로 그 농도가 증가하는 추세를 보이다가 16 시간째에서 최대 혈중 농도치 (11.77 μg/ml)를 보이다가, 이후로는 서서히 감소하는 양상을 나타내었다. 15 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서의 어체내 잔류농도를 관찰하여 보면, 약물 투여후 2 시간에서 6.34 μg/ml 의 다소 높은 혈중 농도를 보이다가 점차로 그 농도가 증가하였다. 이후로 12 시간째에서 최대 혈중 농도치인 12.55 μg/ml 를 나타내다가, 이후로는 급격히 혈중농도가 감소하는 양상을 나타내었다. 이러한 결과는 4종의 분쇄물에 있어서 가장 빠르고, 농도가 높은 흡수·배설의 기전을 가짐을 알 수 있었다. 한편, 30 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서의 체내 배설 속도를 보면 약물 투여후 2시간(5.85 μg/ml)에서 그 농도가 증가하는 추세를 보이다가 15분간 분쇄한 분쇄품의 경우에서와 마찬가지로 12시간째에서 최대 혈중 농도치(11.43 μg/ml)를 보이다가, 이후로는 서서히 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 표준품의 경우에서보다도 현저히 빠른 약물의 흡수·배설 양상을 나타내었으나 15 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 비해서는 다소 완만한 배설기전을 보였다. 또한, 60 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서의 체내 배설 속도를 보면 약물 투여후 2 시간(5.59 μg/ml)에서 그 농도가 증가하는 추세를 보이다가 12 시간째에서 최대 혈중 농도치(10.61 μg/ml)를 보이다가, 이후로는 서서히 감소하는 양상을 나타내었다. 이는 표준품의 경우에서보다도 매우 느린 약물의 흡수·배설 양상으로 나타났다.

Pefloxacin의 경우에 있어서 약물의 소실작용을 검토하여 보면 약물이 어체내에서 모든 부분과 평형에 달하는 one-compartment 모델임을 알 수 있었다[10,19].

Pefloxacin의 약물 동태학적 검토

Pefloxacin의 표준품 및 3종의 분쇄 시간에 따른 분쇄물들의 어체 내에서 혈중농도 측정 결과를 바탕으로 약물동태학 parameters 을 계산 하였다[10,19].

One-compartment model 로 계산한 경우 Table 2 에서 나타내었다. 표준품 pefloxacin 에 있어서의 약물동태학 parameter인 약물 흡수 속도 K₀₁ 은 48.01/hr 으로 나타났으며, 소실속도정수 K₁₀ 은 3.09/hr 였다. 최고의 농도에 도달하는 시간인 T_{max} 의 경우는 13.07 hr, 약물의 반감기인 T_{1/2} 는 0.224 hr, 혈장농도-시간곡선하 면적인 AUC 는

Table 2. Pharmacokinetic parameters by one-compartment model of pefloxacin in blood of Korean rockfish

Parameters(unit)	Grinding time(min)			
	0	15	30	60
AUC($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)	928.13	980.83	945.69	762.48
K_{01} (1/hr)	48.01	50.82	52.59	48.81
K_{10} (1/hr)	3.09	2.43	2.38	2.10
$T_{1/2}$ (hr)	0.224	0.285	0.291	0.330
T_{max} (hr)	13.07	11.21	11.13	9.95
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	11.09	11.48	10.76	9.40

AUC : the area under the drug concentration, K_{01} : first-order absorption, K_{10} : apparent first-order elimination rate constant, $T_{1/2}$: biological half-lives, T_{max} : maximum time, C_{max} : concentration maximum.

928.13 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$, 최고농도인 C_{max} 는 11.09 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 15 분간 분쇄한 pefloxacin 의 분쇄품에 있어서의 약물 흡수 속도 K_{01} 은 50.82/hr 으로 나타났으며, 소실속도정수 K_{10} 은 2.43/hr 였다. 최고의 농도에 도달하는 시간인 T_{max} 의 경우는 11.21 hr, 약물의 반감기인 $T_{1/2}$ 는 0.285 hr, 혈장농도-시간곡선하 면적인 AUC는 980.83 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$, 최고농도인 C_{max} 는 11.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 가장 높은 흡수율과 배설속도 양상을 나타내었다.

한편, 30 분간 분쇄한 pefloxacin 에 있어서의 약물동태학 parameter 인 약물 흡수 속도 K_{01} 은 52.59/hr 으로 나타났으며, 소실속도정수 K_{10} 은 2.38/hr 였다. 최고의 농도에 도달하는 시간인 T_{max} 의 경우는 11.13hr, 약물의 반감기인 $T_{1/2}$ 는 0.291 hr, 혈장농도-시간곡선하 면적인 AUC 는 945.69 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$, 최고농도인 C_{max} 는 10.76 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 였다. 이러한 결과는 pefloxacin 의 표준품에 비해서는 약물의 흡수·소실속도는 빠르게 진행됨을 나타내고 있으나, 15 분간 분쇄한 분쇄품에 비해서는 다소 느리게 일어남을 알 수 있었다.

60 분간 분쇄한 pefloxacin 에 있어서의 약물동태학 parameter 인 약물 흡수 속도 K_{01} 은 48.81/hr 으로 나타났으며, 소실속도정수 K_{10} 은 2.10/hr 였다. 최고의 농도에 도달하는 시간인 T_{max} 의 경우는 9.95 hr, 약물의 반감기인 $T_{1/2}$ 는 0.330 hr, 혈장농도-시간곡선하 면적인 AUC 는 762.48 $\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$, 최고농도인 C_{max} 는 9.40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로 나타나 가장 느린 약물의 대사과정을 나타내었다. 이상의 결과들로 부터 pefloxacin 의 표준품 및 분쇄시간에 따른 3 종의 분쇄품에 있어서의 약물동태학 parameters 들은 one-compartment model 로 해석 가능하다는 것을 알 수 있었

으며, 그 계산되어진 결과들로 부터 15 분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서 어체 내에서의 흡수와 배설기전이 가장 양호하다는 것을 알 수 있었다.

요 약

조피볼락의 간, 근육, 비장, 신장 및 혈액 중에 가한 pefloxacin 의 회수율은 평균적으로 82%로 나타났다. 특히 혈액중에서 10, 1.0, 0.1, 0.01 ppm 에서의 회수율은 각각 78.72 ± 0.99 , 75.53 ± 3.46 , 82.21 ± 4.83 및 81.04 ± 5.33 % 로 다소 낮은 수치를 나타내었으나, chloroform 으로 진탕한 후 methylene chloride 를 가해서 추출 정제한 방법에 비하여 대단히 간단하고, 회수율도 훨씬 높다는 것을 알 수 있었다[24,25].

Pefloxacin 의 표준품과 분쇄 시간(15, 30 및 60 분)에 따른 분쇄품의 어체내에서의 배설 양상을 보면 분쇄품의 경우에 있어서 표준품 보다 최대 흡수시간이 빨라졌으며, 배설 속도 또한 빨라짐을 알 수 있었다. 또한 15분간 분쇄한 분쇄품의 경우 가장 양호한 흡수·배설의 기전을 가짐을 알 수 있었다. 약물동태학 parameters 을 계산한 결과, 어체 내에서 약물의 혈중농도 측정 결과에서와 마찬가지로 15분간 분쇄한 분쇄품의 경우에 있어서 어체 내에서의 흡수와 배설기전이 가장 양호하다는 것을 알 수 있었다. 이상의 결과들로 부터 pefloxacin 의 표준품 및 3 종의 분쇄품에 있어서의 약물동태학 parameters 들은 약물이 어체내에서 모든 부분과 평형에 달하는 one-compartment model 로 해석이 가능하였다.

참 고 문 헌

1. Anadon, A., Marrinez-Larranaga, M. R. and Diaz, M. J. 1993. Pharmacokinetics of enrofloxacin in chicken, *Am. J. Vet. Res.*, **56**(4), 501-506.
2. Barre, J., Houin, G. and Tillement, J. P. 1984. Dose-Dependent Pharmacokinetic Study of Pefloxacin, A New Antibacterial Agent, in Humans, *J. Pharmaceutical Sciences*, **73**(10), 1379-1382.
3. Budavari, S. 1996. The Merck Index(12th Ed.), Merck & Co., White house Station, 7009.
4. Burke, J. T., Wargin, W. A. and Blum, M. R. 1989. High-performance liquid chromatographic assay for chloramphenicol, chloramphenicol-3-monosuccinate and chloramphenicol-1- monosuccinate, *J. Pharmaceu. Sci.*, **69**, 909-912.
5. Choi, W. S. 1996. Grinding rate Improvement Using a Composite Grinding Ball Size for an Ultra-fine Grinding Mill, *J. Soc. Powder Technol. Japan*, **33**(9), 747-752,
6. Choi, W. S. 1998. Grinding rate Improvement Using a Composite Grinding Ball Size for an Ultra-fine Grinding Mill-Applications of Grinding Kinetics Analysis, The Proceedings of 3rd World Congress on Particle Technology, **74**, Brighton.
7. Contrepolis, A., Daldoss, C., Pangon, B. Garaud, J. J., Kecir, M., Sarrazin, C., Vallois, J. M. and Carbon, C. 1984. Pefloxacin in rabbits; protein binding, extravascular diffusion, urinary excretion and bactericidal effect in experimental endocarditis, *J. Antimicrobial Chromatography*, **14**, 51-57.
8. Heo, G. J. and Kim, J. H. 1994. A study on efficacy and safety of antibacterial(pefloxacin methanesulfonate) to cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Paralichthys olivaceus*, *Korean J. Vet. Res.*, **34**(1), 153-163.
9. Horrie, M., Saito, K. and Nose, N. et al. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high performance liquid chromatography, *J. Chromatography B Biomed. Appl.*, **653**(1), 69-76.
10. Kim, D. D. and Yie W. Chien. 1996. Transdermal Delivery of Dide-oxynucleoside-Type Anti-HIV Drugs. 2. The Effect of Vehicle and Enhancer on Skin Permeation, *J. Pharmaceutical Sci.*, **85**(2), 214-219.
11. Long, A. R., Hsi, L. C., Bello, A. C., Malbrough, M. S., Short, C. R. and Baker, S. A. 1990. Method for isolation and liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk, *J. Agric. Food Chem.*, **38**, 427-429.
12. Long, A. R., Short, C. R. and Barker, S. A. 1990. Method for the isolation and liquid chromatographic of eight sulfonamides in milk, *J. Chromatography*, **502**, 87-94.
13. Montay, G., Blain, Y., Roquet, F. and A. Le Hir, 1983. High Performance Liquid Chromatography of Pefloxacin and Its Main Active Metabolites in Biological Fluids, *J. Chromatography*, **272**, 359-365.
14. Ueno, R., Kawahara, S. and Aoki, T. 1995. Preservation od non spore forming test organisms for a simplified bioassay by freezing and freeze-drying, *Fisheries Science*, **61**(2), 345-347.
15. Ueno, R., Okumra, M., Horiguchi, Y. and Kubota, S. S. 1988. Levels of Oxolinic Acid in cultured Rainbow Trout and Amago Salmon after Oral Administration, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**(3), 485-489.
16. Ueno, R., K. Uno, S., Kubota, S. and Horiguchi, Y. 1989. Determination of Oxytetracycline in Fish Tissues by High Performance Liquid Chromatography, *Nippon Suisan Gakkaishi*, **55**(7), 1273-1276.
17. 星野庸二, 堀江正一, 能勢憲英, 岩崎久夫. 1984. 高速液體クロマトダラスイ-による食肉中のテトラサイクリン系抗生物質及びマクロライド系抗生物質の定量, *食衛誌*, **25** (5), 430-435.
18. 未田 豊, 古城典子, 安藤良吉. 1989. 高速液體クロマトダラスイ-による食肉中のテトラサイクリン系抗生物質の定量, *食衛誌*, **30**(1), 42-47.
19. 李民和, 具永順. 1991. 生物藥劑學과 藥物速度論, 新光出版社, 257-425(再版).
20. 김진우, 최동립, 심두생, 서상복. 1994. 수산용약제연구 1994. 수진사업보고서(중양식분야), 508-518.
21. Yamamoto, K. 1995. Grinding in the Preparation of Dosage Forms, *분체와 공업*, **27**(8), 24-29.
22. 약리실 엮음. 수산용약제연구 1998. 수진사업보고서(중양식분야), 159-296.