

식육 중 항균물질 (플루오르퀴놀론계) 동시 다성분 분석법 개선 연구

박동엽¹, 황보원, 조성숙, 최찬영, 조상래, 박애라, 정은희, 변유성

경남축산진흥연구소중부지소
(접수 2006. 4. 12, 제재승인 2006. 6. 19)

Simultaneous determination of four fluoroquinolones in chicken, pork and beef edible muscle by HPLC

Dong-Yeob Park¹, Bo-Won Hwang, Sung-suk Cho, Chan-young Choi,
Sang-Lae Cho, Ae-Ra Park, Eun-Hee Jung, You-Sung Byun

*Central Branch of Gyeongnam Livestock Promotion Research Institute, Changwon,
641-728, Korea*

(Received 12 April 2006. accepted in revised from 19 June 2006)

Abstract

A direct, accurate and sensitive chromatographic analytical method for quantitative determination of four fluoroquinolones (norfloxacin, cirprofloxacin, danofloxacin and enrofloxacin) in chicken, pork and beef edible muscle is proposed in the present study. The developed method was successfully applied to the determination of enrofloxacin, as the main component of commercially available veterinary drugs. The samples were homogenized and the antimicrobials were added, then they were extracted twice with dichloromethane. Fluoroquinolone antibiotics were separated on an agilent 250 × 4 mm, C₁₈, 5 μm, analytical column, at 25°C. The mobile phase consisted of a mixture of DW:acetonitrile:triethylamine(80:19:1%, v/v, pH 3.0) leading to retention times less than 14 min. at a flow rate 0.5 mL/min. These fluoroquinolones were detected by liquid chromatography with fluorescence at 290 nm excitation and 465 nm emission. The limits of quantification in each edible muscle (chicken, pork, and beef) were 0.32–6.54 ng/g. Using 0.5 g of each sample, average recovery rates at fort-

¹Corresponding author

Phone : +82-55-211-5770, Fax : +82-55-211-5779

E-mail : dong04@gsnd.net

fication levels of 0.05, 0.1 and 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ranged 70.14–71.71% for NFX, 71.87–73.89 % for CFX, 82.16–92.35% for DFX, and 90.13–98.12 for EFX.

This is a simple and economic method to quantify the presence of NFX, CFX, EFX and DFX in edible muscle of animal origin.

Key words : Fluoroquinolones, NFX, CFX, EFX and DFX, HPLC

서 론

가축 사육 시 질병예방 및 치료 등의 목적으로 항생제, 합성항균제 등을 직접 투여하거나 사료에 첨가하여 경구 투여하는 방법으로 축주의 무분별한 오·남용에 의하여 축산물의 잔류 가능성이 높아지고 있다. 이에 식육 중 잔류물질 허용기준치 등을 마련하여 규제를 하고 있지만 기대에 미치지 못하고 있는 실정이다.

기존에는 세파로스포린계, 페니실린계, 아미노글리코사이드계, 마크로라이드계 등이 주류를 형성하고 있었으나 이들 항생제에 대한 내성균주가 증가함에 따라 유효성이 떨어지면서 플루오르퀴놀론계 항균제의 사용이 증가하고 있다¹⁾.

플루오르퀴놀론계는 광범위 합성항균제로서 세균에서 supercoiling을 풀어서 DNA 전사에 관여하는 topoisomerase II (DNA-gyrase)를 억제하여 살균작용을 나타내며, 다단계 변이(multistep mutation)에 내성이 유발되므로 내성균의 출현 가능성이 낮은 것으로 보고 있다²⁾.

플루오르퀴놀론계 약물은 그람양성세균, 그람음성세균, *Mycoplasma* spp 뿐만 아니라 *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp 등에도 강한 항균력을 지니고 있기 때문에 사람과 가축의 치료 및 예방 약제로 널리 이용되고 있다³⁻⁵⁾. 가축에서는 호흡기, 비뇨기, 소화기 감염증 치료에 주로 사용되고 있으며 어류용으로도 사용되고 있다⁶⁾. 그러나 최근에 미국에서 플루오르퀴놀론계 저항성 *Salmonella* spp와 *Campylobacter* spp^{7,8)}가 검출되었으며 이는 플루오르퀴놀론

계 약물의 남용으로 조류에서 *Campylobacter* spp의 저항성이 증가되어 야기된 것으로 추정된다. 이와 같은 식품 중 항생제의 잔류로 인한 내성 또는 독성이나 알레르기, 기타의 공중보건학적 위험성 야기 등이 있으므로 미국의 FDA, 캐나다, FAO/WHO, 일본 등에서도 규제가 강화되고 있다⁹⁻¹¹⁾.

유럽에서는 enrofloxacin (EFX)과 cirprofloxacin (CFX)에 대한 잔류허용한계가 간장과 근육에서 30 ppb로 설정되어 있으며, 스위스에서는 oxolonic acid와 EFX에 대한 잔류허용한계가 우유, 계란 및 식육에서 10 ppb로 설정되어 있다¹²⁾. 이에 우리나라에서도 식품공전에 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 및 알에 대하여 EFX, danofloxacin (DFX)에 대하여 잔류허용기준치를 고시하여 규제를 하고 있다¹³⁾.

퀴놀론계 약물의 잔류분석법으로는 미생물학적 방법, 면역학적 방법¹⁴⁾, 박충크로마토그래피¹⁵⁾, 액체크로마토그래피^{16,17)}, 액체크로마토그래피 질량분석기¹⁸⁾ 등이 사용되고 있다. 이들 중 액체크로마토그래피를 이용한 전처리방법으로 액상추출방법¹⁹⁾이나 고체상추출방법²⁰⁾이 보고 되고 있다. Barker 등²¹⁾은 전처리시간 및 유기용매의 소요를 줄이기 위하여 시료 고체상분산처리법 (matrix solid phase dispersion, MSPD)을 보고 하였으며, 현재 이 방법이 우리나라 식품공전 및 축산물 가공기준 및 규격서에 전처리 방법의 하나로 고시되어 활용되고 있다¹³⁾.

본 연구에서는 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 대한 전처리 방법으로 단일용매 dichloromethane을 이용하여 퀴놀론계열의 4성분 (norfloxacin (NFX), CFX, DFX, EFX)을

신속하면서도 동시에 분석할 수 있는 액상 추출방법과 분석성분에 적합한 기기분석조건을 확립하여 현재 실시하고 있는 식육 중 잔류항생물질검사에 적용하여 업무 효율성 제고와 민원업무 신속처리에 활용코자 실시하였다.

재료 및 방법

기기

전처리에 이용된 기기로는 원심분리기 (Bakeman, USA), 농축기 (Turbovac, USA), Vacuum manifold (Sulfelco)를 사용했고 분석 시에는 다이오드어레이 검출기 및 형광 검출기가 장착된 액체크로마토그라피(Hewlett-Packard 1100 series, USA), 분석 칼럼은 agilent C₁₈ (250 × 4.6 mm id, 5 μm)를 이용하였다.

표준품 및 시약

플루오르퀴놀론 표준품은 norfloxacin (NFX, Dr Ehrenstorfer), cirprofloxacin (CFX, Dr Ehrenstorfer), danofloxacin (DFX, Dr Ehrenstorfer), enrofloxacin (EFX, Dr Ehrenstorfer)을 사용하였고, 분석에 이용된 n-hexan, dichloromethane, methanol, acetonitrile 및 triethylamine은 HPLC grade로 J. T. Baker (USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 buffer phosphate solution (0.1M, pH 7.2), oxalic acid 등 실험에 사용된 시약은 특급 및 그 이상의 수준을 사용하였다.

또한 본 시험에 사용된 돼지고기 및 쇠고기는 도축장에서 근육 부위를 약 500g정도 취하여 사용하였고, 닭고기는 시중에 유통되는

것을 구하여 사용하였다.

표준용액 및 첨가시료 조제

각각의 플루오르퀴놀론계 표준품 약 10 mg을 취하여 100 ml 갈색 용량 플라스크에 넣고 methanol에 완전히 녹인 다음 100 μg/ml 농도로 만들어 표준원액 (stock solution)으로 하였다. 표준원액을 희석 용매인 이동상 용매로 희석하여 10 μg/ml로 제조하여 표준용액 (working solution)으로 사용하였다. 첨가시료 (spiked sample)는 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기 0.5 g을 시험관에 취하여 4종 혼합표준용액 (10 μg/ml) 0.01, 0.005, 0.0025 ml씩을 첨가하여 0.2, 0.1, 0.05 μg/g으로 조제하였다.

표준곡선 작성

플루오르퀴놀론계 4종의 혼합표준용액 (10 μg/ml)을 100 ml 용량플라스크에 0.1, 0.05, 0.025 μg/ml으로 희석하였다. 3개 농도로 희석된 표준용액을 50 μl씩 3회 반복 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 플루오르퀴놀론계 약물에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성하였다.

분석조건

4종의 플루오르퀴놀론계의 정확한 검출을 위한 이동상 용매는 3차 종류수 : acetonitrile : triethylamine (80 : 19 : 1)의 비율로 혼합하여, phosphoric acid로 pH 3.0으로 맞추고 0.45 μm nylon membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다. 성분분석을 위한 기기분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC condition for determination of fluoroquinolones

Items	Conditions		
Mobile phase	DW : acetonitrile : triethylamine (800 : 190 : 10), pH 3		
Detector	FLD	Wavelength PMT gain Response time	Excitation 290 nm, Emission 465 nm 9 6
Flow rate	0.5 mL/min		
Column temp	25 °C		
Column	250 mm x 4.6 mm, C ₁₈ , 5 μl		
Injection volume	50 μl		

시료 전처리

채취한 각 시료의 근육부위를 균질하여 0.5 g을 15 mL의 원심관에 취하고 phosphate buffer 2 mL와 dichloromethane 8 mL를 가하여 2분 동안 vortex로 충분히 흔든 다음, 1분 동안 초음파한 후 20분 동안 4,000 rpm으로 원심분리하였다. 상층액은 버리고 용매

충만 다른 농축용기에 담고, 조직은 다시 dichloromethane 6 mL로 추출한 뒤 20분 동안 원심 분리하여 용매층을 전용매와 혼합하였다. 모아진 용매층은 30 °C에서 질소가스로 농축한 후 이동상 용매 500 μL를 가한 뒤 초음파 세척기에서 10분간 완전히 용해시킨 후, 상층액을 0.45 μm 필터로 여과하여 50 μL를 HPLC에 주입하여 분석하였다.

-
- 0.2~0.5 g sample
 ↓ 0.1M phosphate buffer(pH7.2) 2 mL
 Homogenized
 ↓ Dichloromethane 8 mL
 Vortexed for 1~2 min, ultrasonication for 1 min
 ↓
 Centrifuge at 4,000 rpm for 20 min
 ↓ ① transfer organic phase layer to other tube
 Tissue sediment in tube
 ↓ Dichloromethane 6 mL
 Centrifuge at 4,000 rpm for 20min after Vortexed for 1 min
 ↓
 Combine upper aqueous layer(organic phase) to ① tube
 ↓
 Evaporated at 30 °C under nitrogen stream
 ↓
 Dissolve by mobil phase sol. 500 μL
-

Fig 1. The sample preparation scheme of fluoroquinolone in edible muscle

결과 및 고찰

HPLC 측정조건 검토

측정파장 선택 : 퀴놀론계 약물은 이종 방향족(heteroaromatic), 이중환(bicyclic)을 가지고 있는 화합물로 많은 호기성 세균에 대하여 우수한 활성을 가지나 혐기성 세균에 대해서는 다소 미약한 활성을 나타낸다. 그래서 혐기성 세균에 대한 활성이 증가된 새로운 플루오르퀴놀론계 약물들이 개발되어지고 있다^{21, 22)}.

플루오르퀴놀론계는 1990년도 개발되어 화학적구조식의 작용기 R1, R6, R7 및 X Radical에 따라 약물의 명명을 달리하고 있으며 그 작용기에 따라 다양한 효과를 나타내고 있다 (Fig 2).

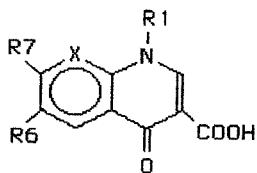


Fig 2. Chemical structure and characteristic of fluoroquinolones

Table 2. A comparison of each wavelength and detectors

Detector	Wavelength
Fluororescene detector (FLD)*	Excitation 278 nm, Emission 455 nm
Fluororescene detector (FLD)	Excitation 290 nm, Emission 465 nm
PDAD	UV 275 nm

* : Official announcement

이동상의 검토

HPLC 분석을 위한 이동상용매는 식품공전에 고시된 DW : acetonitrile : methanol : Triethylamine을 800 : 170 : 30 : 4의 비율로 제조하여 식품공전 분석조건에 따라 분석하였던 결과 분

현재 식품공전에 고시된 플루오르퀴놀론계 항균제는 DFX와 EFX 2종으로 HPLC의 형광검출기를 이용하여 분석토록 되어 있다¹³⁾. 형광검출기의 파장은 여기파장 278 nm, 측정파장 455 nm로 두 성분을 분석시 DFX가 다른 성분에 비하여 감도가 20~25배 정도 높기 때문에 다성분을 동시에 분석하였을 때 상대적으로 다른 성분을 분석하기 위한 크로마토그램이 불균형을 이루고 있다. 이런 문제를 보완하기 위하여 DFX의 감도를 다른 성분보다 2~10배 줄이고 상대적으로 다른 성분의 감도를 2~10배 정도 향상시키는 파장을 찾아 확립하였다 (Table 2).

플루오르퀴놀론계 4종의 표준용액을 자외선검출기 (DAD: diod array detector)를 이용하여 분석가능 여부를 검토한 결과, 자외선파장은 275 nm에서 가장 감도가 좋았으며 동시에 분석시 각 성분은 균형있는 분리를 나타내었다 (Fig 4). 그러나 시료 전처리 후 자외선 검출기에서의 분석은 방해물질에 의한 피크가 각 성분과 유사한 물질이 정확한 정량에 방해를 주는 것으로 확인되었다. 이는 각 시료의 전처리에서 방해물질이 완전히 제거되지 않았으며 이런 물질이 275 nm파장에서 검출되는 것으로 사료되었다.

석시간은 15~25분 소요되었고, 이동상용매의 소요량은 30 mL정도 소비되었다 (Table 3).

반면에 이동상용매를 새로이 적용한 DW : acetonitrile : Triethylamine을 800 : 190 : 10의 비율로 제조하여 분석하였던 결과 분석시간은 10~15분 소요되었고, 이동상 용

매의 소요량은 8 ml 정도 소비되었다 (Table 3). 이와 같이 기존 용매 조성과 비교하였을 때 용매의 수는 4종류에서 3종류로, 소요시간

은 5-10분정도 절약할 수 있었으며, 용매의 소비량도 3.75배 절약할 수 있었다.

Table 3. A comparison of investigate of mobile phase

Chemical regents & solvent	Ration	Flow rate (ml / min)	Analysis time	Waste sol / Sample
D.W : acetonitrile : triethylamine	800 : 190 : 10	0.5	10-15 min	8 ml
D.W : acetonitrile : Methanol : triethylamine ¹⁾	800 : 170 : 30 : 4	1.2	15-25 min	30 ml

¹⁾ Official announcement

표준곡선 작성

5종 혼합표준용액을 0.05-0.20 µg/ml의 농도범위에서 HPLC에 주입하여 형광검출기

로 여기파장 290 nm, 흡수파장 455 nm에서 측정하였을 때 NFX, CFX, DFX, EFX 모두에서 상관계수 0.999 이상의 직선상을 나타내었다 (Fig. 3).

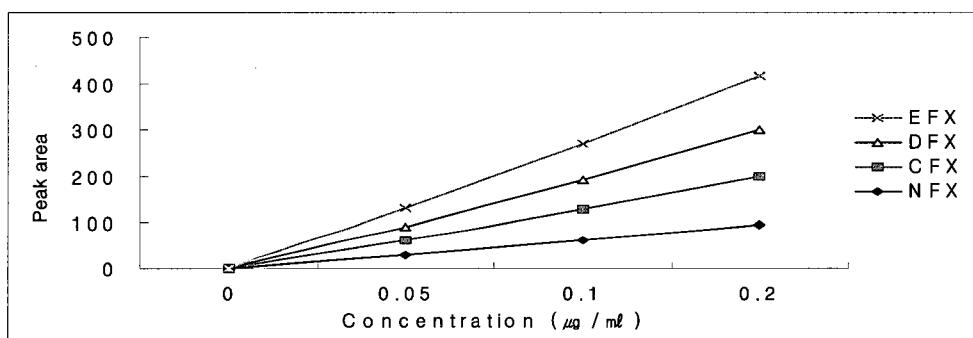


Fig 3. The standard calibration curves of fluoroquinolones ($r>0.999$)

FLD1, Ex=290, Em=465

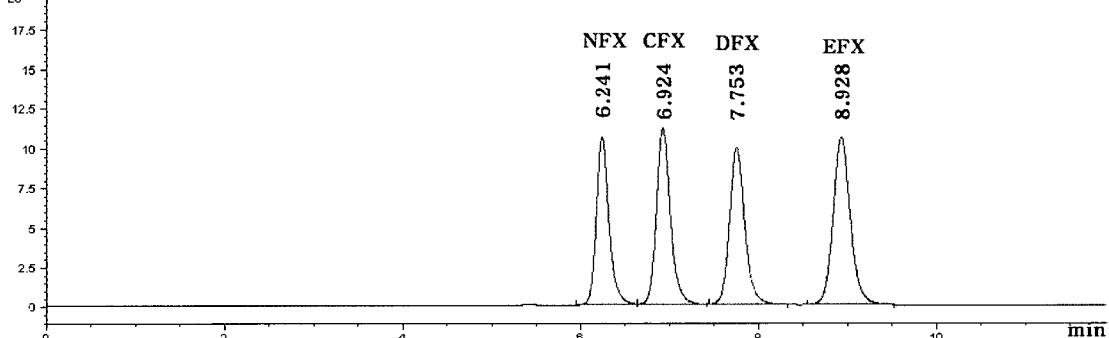


Fig 4. Typical HPLC chromatogram of mixed fluoroquinolones standards with 0.1 µg/ml of norfloxacin (NFX), 0.1 µg/ml cirprofloxain (CFX), 0.01 µg/ml danofloxacin (DFX), 0.1 µg/ml enrofloxacin (EFX)

HPLC chromatogram

4종의 플루오로퀴놀론계 약물의 표준용액에 대한 HPLC 동시분석 크로마토그램은 Fig 4에서 보는 바와 같이 각 성분의 peak는 양호한 분리도를 나타내었고, peak tailing 없이 대칭성을 나타내며 잘 분리됨을 확인할 수 있었다.

본 조사에서 확립된 분석조건과 제시된

시료 추출방법을 이용하여 각 시료별(닭고기, 돼지고기, 쇠고기)추출액을 분석하였던 크로마토그램을 비교한 결과 어떠한 방해 피크 없이 분석 가능함을 확인할 수 있었다 (Fig 4).

이는 Seo 등⁵⁾이 돼지 및 계란에서 4종의 플루오로퀴놀론계 항균물질을 연구한 결과와 준하는 분리도를 나타냈으며 10분 내에 방해 물질 없이 신속하게 분석할 수 있었다.

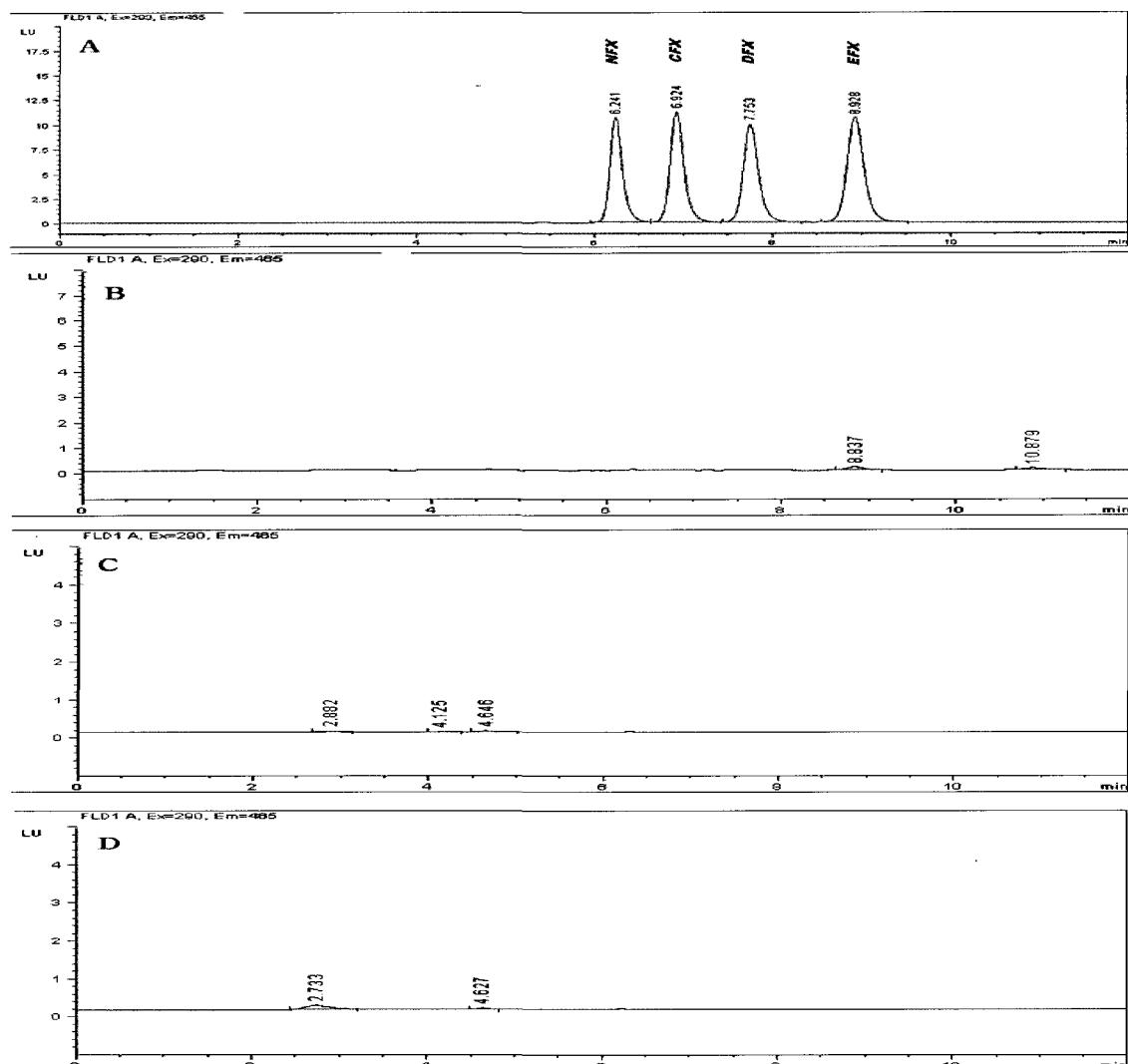


Fig 5. Chromatograms of A) mixed standard fluoroquinolones, B) chicken muscle extract, C) pork muscle extract, and D) beef muscle extract

정확도 및 정밀도 조사 결과

회수율 검사 결과

정확도 확인하기 위하여 예비실험을 통한 플루오르퀴놀론계 약물이 잔류되지 않는 것으로 확인된 각 시료를 선별하여 0.05~0.2 µg/g의 농도로 첨가한 후 회수율을 측정한 결과 돼지고기에서 NFX 68.87~75.67% (71.71), CFX 68.33~74.33% (71.87), DFX 79.89~84.46

(82.16), EFX 87.43~95.04 (90.10)이었고 (Table 4), 쇠고기에서는 NFX 69.63~70.77 (70.14), CFX 71.60~75.37 (73.49), DFX 82.65~85.27 (84.06), EFX 86.07~92.93 (90.13)로 나타났으며 (Table 5), 닭고기에서는 NFX 69.73~73.43 (71.24), CFX 68.62~79.60 (73.84), DFX 89.41~93.98 (92.35), EFX 96.80~99.89 (98.12)를 보였다 (Table 6).

Table 4. Accuracy and repeatability of fluoroquinolones in spiked pork muscle (n=5)

Compounds	Recovery rate (%)			Mean
	0.05 (µg/g)	0.1 (µg/g)	0.2(µg/g)	
NFX	68.87 ± 5.33*	70.60 ± 4.50	75.67 ± 2.08	71.71 ± 3.97
CV	7.74	6.38	2.75	5.62
CFX	72.93 ± 5.97	68.33 ± 4.51	74.33 ± 4.73	71.87 ± 5.07
CV	8.19	6.60	6.36	7.05
DFX	84.46 ± 3.73	79.89 ± 2.35	82.14 ± 3.50	82.16 ± 3.19
CV	4.41	2.94	4.26	3.87
EFX	95.04 ± 3.26	87.43 ± 0.51	89.03 ± 2.78	90.50 ± 2.18
CV	3.43	0.59	3.12	2.38

* Mean ± STD

Table 5. Accuracy and repeatability of fluoroquinolones in spiked beef muscle (n=5)

Compounds	Recovery rate (%)			Mean
	0.05 (µg/g)	0.1 (µg/g)	0.2 (µg/g)	
NFX	70.03 ± 6.53*	70.77 ± 4.97	69.63 ± 5.60	70.14 ± 5.70
CV	7.31	7.02	8.04	8.13
CFX	73.50 ± 8.85	71.60 ± 6.40	75.37 ± 5.12	73.49 ± 6.79
CV	8.01	7.49	6.79	7.25
DFX	85.27 ± 3.33	84.27 ± 5.43	82.65 ± 4.38	84.06 ± 4.38
CV	3.91	6.44	5.30	5.21
EFX	91.40 ± 5.05	86.07 ± 2.66	92.93 ± 5.72	90.13 ± 4.48
CV	5.52	3.09	6.16	4.92

* Mean ± STD

NFX, CFX의 평균 회수율을 비교해보면 돼지고기, 쇠고기 및 닭고기에서 70.14~73.84

%의 수준으로 비슷한 결과를 보였고, DFX와 EFX은 돼지고기와 쇠고기가 84.06~90.13

%로 나타난 반면에 닭고기는 92.35–98.12 %로 가장 높은 회수율을 보였다. 이는 Codex의 권장수준 범위가 10–100 ppb 일 경우 회수율 70–110%, 100 ppb 이상일 경우 80–110%인 점을 감안할 때 권장수준내의 좋은 결과를 보였다 (Table 4, 5, 6).

각 실험별 4종에 대한 평균 변이계수 (CV)는 0.18–8.19%로 수의과학검역원 연구보고서 등에서 발표한 계란에 대한 변이계수 5.0–10.0%와 유사한 결과를 보였다 (Table 4, 5, 6).

Table 6. Accuracy and repeatability of fluoroquinolones in spiked chicken muscle (n=5)

Compounds	Recovery rate(%)			
	0.05 ($\mu\text{g/g}$)	0.1 ($\mu\text{g/g}$)	0.2 ($\mu\text{g/g}$)	Mean
NFX	69.73 ± 5.50	70.57 ± 2.48	73.43 ± 5.61	71.24 ± 4.53
CV	7.88	3.51	7.64	6.34
CFX	68.62 ± 5.95	73.30 ± 4.53	79.60 ± 2.26	73.84 ± 4.25
CV	8.67	6.18	2.85	5.90
DFX	89.41 ± 6.44	93.98 ± 6.69	93.67 ± 7.60	92.35 ± 6.91
CV	7.21	7.12	8.12	7.48
EFX	96.80 ± 2.10	97.66 ± 1.80	99.89 ± 0.18	98.12 ± 1.36
CV	2.17	1.85	0.18	1.40

* Mean ± STD

Table 7. Limite of detection (LOD) and limit of Quantification (LOQ) of fluoroquinolones in porks, beefs, and chicken muscles

Compounds	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Norfloxacin	2.98 – 3.31	4.69 – 6.54
Cirprofloxacin	2.35 – 2.75	3.12 – 3.53
Danofloxacin	0.23 – 0.28	0.32 – 0.41
Enrofloxacin	3.24 – 3.60	4.92 – 6.52

본 연구에서 CFX, NFX의 평균 회수율은 각 시료별로 유사한 결과를 보였고, 또한 검역원에서 조사 발표한 결과와도 비슷하였으나, DFX, EFX의 평균 회수율은 82.16–98.12로 검역원에서 조사한 62–78%보다 높은 결과를 보였다²³⁾.

Posyniak 등²⁴⁾은 돈육 중에서 4종의 플루오르퀴놀론계 약물을 분석하여 평균 회수율 81–89%로 보고하였고, Gorla 등²⁵⁾은 평균 회수율이 36–85%로 보고 하였는데 이와 같은 회수율의 차이는 시료 전처리, 시료종류 및 분석 성분의 차이에 따른 결과로 사료되었다.

검출한계 및 정량한계

Fluoroquinolones계의 4종에 대한 검출한계 (LOQ)는 크로마토그래피의 signal to noise의 비가 3 이상의 경우를, 정량한계는 10 이상의 경우를 CDER (center for drug evaluation and research, FDA)의 가이드라인의 계산방법에 따라 계산하였다²⁶⁾. 닭고기, 돼지고기 및 쇠고기에서 플루오르퀴놀론계 4종 대한 검출한계의 경우 NFX 2.98–3.31 ppb, CFX 2.35–2.75 ppb, DFX 0.23–0.28 ppb, EFX 3.24–3.60 ppb 수준이었으

며, 정량한계는 NFX 4.69–6.54 ppb, CFX 3.12–3.53 ppb, DFX 0.32–0.41 ppb, EFX 4.92–6.52 ppb 수준으로 아주 낮은 농도까지 정량이 가능하였다 (Table 7).

Fluoroquinolones계의 검출한계를 Seo 등⁵⁾은 EFX 등 4종을 분석한 결과 계란에서 0.85–1.0 ng/g로 보고한 바 있으며, 손¹⁴⁾은 닭고기, 새우 등 다양한 시료에서 CFX, EFX 을 분석한 결과 근육에서 검출한계를 5 ng/g로 보고하였고, 수의과학검역원 2002년 연구보고서²³⁾에서는 계란에서 EFX 등 7종을 분석한 결과 0.2–21.9 ppb로 보고하였다. 이는 본 연구에서도 유사한 결과를 보였다.

결 론

1. NFX, CFX, DFX 및 EFX의 4종의 플루오르퀴놀론계 약물에 대한 HPLC를 이용한 최적분석 조건을 검토하였을 때 이동상 용매는 DW : Acetonitrile : triethylamine (80 : 19 : 1), 칼럼은 agilent 250 mm x 4.6 mm (C¹⁸, 5 um), 검출기는 형광검출기의 여기파장 290 nm, 측정파장 465 nm에서 동시에 검출할 때 모두 상관계수 0.999 이상의 직선상을 나타내었다.
2. 돼지고기, 쇠고기 및 닭고기에 대한 4종의 플루오르퀴놀론계 약물에 대한 시료 전처리는 dichloromethane 2회로 추출하여 분석하였을 때 어떠한 방해 피크 없이 분석할 수 있었다.
3. 돼지고기, 쇠고기 및 닭고기에 표준용액 0.05–0.2 ppm으로 첨가하여 정확도와 정밀도를 측정한 결과 평균회수율은 NFX 70.14–71.71%, CFX 71.87–73.89 %, DFX 82.16–92.35%, EFX 90.13–98.12 %로 나타났으며, 각 실험별 평균 변이계수는 0.18–8.85%를 보였다.
4. 각 시료에 대한 4종의 플루오르퀴놀론계 약물의 동시분석에 있어 검출한계는 0.23–0.28 ppb이었으며, 정량한계는 0.32–6.54 ppb로 낮은 농도도 검출할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. 서계원. 2000. 계란중 Fluoroquinolone 계 합성항균제의 잔류에 관한 연구. 전남 대학교 박사학위 논문 : 65–87.
2. Hooper DC, Wolfson JS. 1993. Quinolone Antimicrobial agent, 2nd ed, David C and John S, Washington DC.
3. Gigosos PG, Revesado PR, Cadahia O, et al. 2000. Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A* 871(1–2) : 31–36.
4. Wright DH, Herman VK, Konstantinides FN, et al. 1998. Determination of quinolone antibiotics in growth media by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 709(1) : 97–104.
5. Seo KW, Lee JI, Lee CY, et al. 2002. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) for the isolation and LC determination of fluoroquinolones in eggs. *Kor J Vet Publ Hlth* 26(4) : 269–281.
6. Yorke JC, Froc P. 2000. Quantitation of nine quinolones in chicken tissues by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr A* 882(1–2) : 63–77.
7. Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, et al. 1997. Emerging quinolone-resistant *Salmonella* in the United States. *Emerg Infect Dis* 3(3) : 371–372.
8. Smith KE, Besser JM, Hedberg CW, et al. 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minne-

- sota, 1992-1998. Investigation Team. *N Engl J Med* 340(20) : 1525-1532.
9. Barry C. 1993. The analytical testing followed by laboratory service division of agriculture Canada for veterinary drug residues in eggs, In proceedings of the euroresidues II conference on residues of veterinary drugs in food. Veldhoven The Netherlands 3-5, 170-175.
 10. Posyniak A, Zmudzki J, Semeniuk S, et al. 1999. Determination of fluoroquinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 13(4) : 279-285.
 11. Horie M, Saito K, Nose N, et al. 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin and ofloxacin in chicken tissue by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 653(1) : 69-76.
 12. Charriere R, Leiser W, Dousse R. 2003. Residue of veterinary drugs in food, proceeding of the Euroresidue II. Conf Veldhven The Netherlands 3-5, 241-245.
 13. 식품의약품안전청. 2000. 식품의 기준 및 규격
 14. 손성완. 1999. 동물성 식품내에 퀴놀론계 항균물질 검출에 관한 연구, 서울대학교 박사학위 논문. 129.
 15. Juhel GM, Abjean JP. 1998. Screening of quinolones residues in pig muscle by planer chromatography. *Chromatographia* 47(12) : 101-104.
 16. Hussain MS, Chukwumaeze-Obiajunwa V, Micetich RG. 1995. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay for norfloxacin utilizing fluorescence detection. *J Chromatogr B Biomed Appl* 663(2) : 379-384.
 17. Horie M, Saito K, Nose N, et al. 1994. Determination of mirosmamicin in animal tissues by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 655(1) : 47-52.
 18. Suhren G, Hammer P, heeschem W. 1996. Detection of residues of quinolones in milk, in proceedings of the euroresidue III conference on residues of veterinary drugs in food, Veldhoven. *The Netherlands* 6-8, 917-921.
 19. Guyonnet J, Pacaud M, Vugia D, et al. 1996. Routine determination of flumequine in kidney tissue of pig using automated liquid chromatography. *J Chrom B* 679: 177-184.
 20. Barker SA, Long AR, Short CR. 1989. Isolation of drug residues form tissue by solid phase dispersion. *J Chromatogr* 475 : 353-361.
 21. Kung K, Riond JK, Wanner M. 1993. Pharmacokinetics of enrofloxacin and its metabolite cirprofloxacin after intravenous and oral administration of enrofloxacin in dog. *J Vet Pharmacol Ther* 16 : 462-468.
 22. Goldstein EJ, Citron DM, Hunt Gerardo S, et al. 1997. Comparative *in vitro* activities of DU-6859a, levofloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and ciprofloxacin against 387 aerobic and anaerobic bite wound isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 41 (5): 1193-1195.
 23. 국립수의과학검역원. 2003. 2002년 수의과학기술개발사업 연구보고서 : 147-153.

24. Posyniak A, Zmudzki J, Semeniuk S, et al. 1999. Determination of fluoro-quinolone residues in animal tissues by liquid chromatography. *Biomed Chromatogr* 13(4) : 279–285.
25. Gorla N, Chiostri E, Uginia A, et al. 1997. HPLC residues of enrofloxacin and ciprofloxacin in eggs of laying hens, *Int J Antimicrob Agents* 9 : 253–256.
26. CDER (Center for Drug Evaluation and Research, FDA) Reviewer Guidance. 1994. Validation of chromatography Methods.