

博士學位論文

어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제
분석 및 휴약기간 설정 연구



濟州大學校 大學院

食 品 工 學 科

金 豐 鎬

2006年 8月

어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 분석 및 휴약기간 설정 연구

指導教授 河 璉 桓

金 豊 鎬

이 論文을 工學 博士學位 論文으로 提出함

2006年 8月

金豊鎬의 工學 博士學位 論文을 認准함

審査委員長 金 洙 賢 印

委 員 姜 永 周 印

委 員 高 榮 煥 印

委 員 李 泰 植 印

委 員 河 璉 桓 印

濟州大學校 大學院

2006年 8月

**Simultaneous Determination of Residual Fluoroquinolones
in The Fishery Products and Establishment of Their
Withdrawal Time**

Poong-Ho KIM

(Supervised by Professor Jin-Hwan Ha)



A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF ENGINEERING

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND ENGINEERING
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

AUGUST 2006

목 차

List of Figure	iv
List of Table	vi
Summary	viii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	9
1. 시약	9
2. 시험분석장비	9
3. 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 분석	10
1) 표준용액 제조	10
2) 이동상 조제	10
3) 플루오로퀴놀론계 항균제의 최대흡수파장 선정	10
4) 표준곡선의 작성	10
5) 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 추출 조건	11
6) 회수율 측정	13
7) 검출한계의 측정	13
4. 양식어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류 실태조사	14
1) 어패류양식장의 선정	14
2) 대상어패류	15
5. 수산용 동물약품에 대한 양식어류의 휴약기간 설정	17

1) 실험어	17
2) 항균제 투여방법	17
3) 시료채취	17
4) 통계처리에 의한 휴약기간 계산	18
Ⅲ. 결과 및 고찰	19
1. 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 분석방법 개발	19
1) 최적 분석조건	19
(1) 측정과장의 선정	19
(2) 이동상의 검토	21
(3) 검출기의 선택	27
(4) 플루오로퀴놀론계 항균제의 최적분석 조건	29
2) 어패류에서 추출한 플루오로퀴놀론계 항균제의 분석 결과	32
3) 표준용액 검량선의 작성	35
4) 검출한계 및 정량한계 측정	35
5) 어류 및 패류에서의 회수율의 측정	38
6) 플루오로퀴놀론계 항균제의 안정성 시험	45
2. 남해안 양식 어패류에 대한 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태 조사 50	
1) 양식어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태 조사	50
(1) 양식어류 중의 어종별 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태	50
(2) 양식어류에 대한 시기별 플루오로퀴놀론계 항균제 검출율 비교	55
(3) 지역별 양식어류에 대한 항균제 잔류량 모니터링	58
2) 출하전 단계 양식어류 중의 항균제 잔류량 모니터링	63
3) 양식패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 오염 모니터링	67
4) 양식어류 중의 항균제 잔류 모니터링 결과 평가	70

3. 수산용 동물용의약품에 대한 양식어류의 휴약기간 설정 연구	72
1) 넙치의 엔로플록사신 휴약기간 설정 연구	73
(1) 투약한 넙치 근육중의 엔로플록사신 축적 및 배출	73
(2) 엔로플록사신의 휴약기간의 계산	79
2) 넙치의 시프로플록사신 휴약기간 설정 연구	85
(1) 투약한 넙치 근육 중의 시프로플록사신 축적 및 배출	85
(2) 시프로플록사신의 휴약기간의 계산	88
 IV. 요약	 95
참고문헌	99
감사의 글	109



List of Figures

Fig. 1. Extraction and clean up procedures for the analysis of fluoroquinolones in the fish and shellfish muscle.	12
Fig. 2. UV absorption spectra of five fluoroquinolones.	20
Fig. 3. Chromatogram of fluoroquinolones used by the method of Gigoso et al..	22
Fig. 4. Chromatograms of fluoroquinolones at various pH of phosphoric acid.	24
Fig. 5. Chromatograms of fluoroquinolones at various concentrations of phosphoric acid.	25
Fig. 6. Chromatograms of fluoroquinolones at various ratio of 0.1 M phosphoric acid to acetonitrile.	26
Fig. 7. Chromatograms of fluoroquinolones by THF amount.	28
Fig. 8. Comparison of chromatograms of fluoroquinolones by UV and fluorescence detector.	30
Fig. 9. Chromatograms of five fluoroquinolones in fish muscle.	33
Fig. 10. Calibration curves of five fluoroquinolones standard solution.	36
Fig. 11. Stability of stock solution during storage according to the concentration and storage temperature.	46
Fig. 12. Stability of working solution during storage according to the concentration and storage temperature.	48
Fig. 13. Stability of spiked sample during storage according to the concentration and storage temperature.	49
Fig. 14. Detection rates of fluoroquinolones in the muscle of the different farmed fish species.	54

Fig. 15. Monthly detection rate of fluoroquinolones in the muscle of farmed fish.	56
Fig. 16. Detection rate of fluoroquinolones in the farmed finfish collected from the different local area.	65
Fig. 17. Detection rate of fluoroquinolones in the farmed finfish at shipping step for market..	66
Fig. 18. Withdrawal time of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the first examination.	75
Fig. 19. Withdrawal time of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the second examination.	78
Fig. 20. Concentration-time curve of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin.	82
Fig. 21. Concentration-time curve of the level of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin.	83
Fig. 22. Withdrawal time of the ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the first examination.	87
Fig. 23. Withdrawal time of the ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the second examination.	90
Fig. 24. Concentration-time curve of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin.	92
Fig. 25. Concentration-time curve of the levels of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin.	94

List of Tables

Table 1. Number of fish samples collected at the surveyed fish farms	16
Table 2. The optimal conditions of HPLC analysis for determination of five fluoroquinolones in fishery products	31
Table 3. Retention time of fluoroquinolones in fish muscle at HPLC analysis ·	34
Table 4. Limits of detection(LOD) of fluoroquinolones in some fisheries ···	37
Table 5. Limits of quantitation(LOQ) of fluoroquinolones in some fisheries	39
Table 6. Average recovery* of fluoroquinolones in olive flounder muscle (%)·	41
Table 7. Average recovery* of fluoroquinolones in eel muscle(%)	42
Table 8. Average recovery* of fluoroquinolones in shrimp muscle (%)	43
Table 9. Average recovery* of fluoroquinolones in oyster (%)	44
Table 10. Ranges of residual fluoroquinolones in the muscle of the different farmed fish species	51
Table 11. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the muscle of the farmed fish from 2004 to 2005	59
Table 12. Range of residual fluoroquinolones in the farmed finfish at shipping step for market	64
Table 13. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the oyster cultured at the farm	68
Table 14. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the mussel	69
Table 15. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the first examination	74

Table 16. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the second examination	77
Table 17. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin	80
Table 18. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the first examination	86
Table 19. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the second examination ...	89
Table 20. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin	91



Summary

In Korea, the industrial scale fish aquaculture started in 1980s and the production rate has been annually increasing by development of farming techniques and the use of the therapeutic and disease preventive fisheries medicine. In 2005, about 30 kinds of fisheries medicine are being sold in Korean market and tetracyclines make up 60% of the total sales amount. But tetracyclines resistant bacteria have been appeared due to a long-term exposure and fluoroquinolones are being noticed as a substitute and several kind of fluoroquinolones such as ciprofloxacin and enrofloxacin are being used.

Fluoroquinolones show a broad spectrum activity a bactericidal by inactivation of bacterial DNA-gyrase and good oral absorption in the animals being treated. Therefore, fluoroquinolones is one of the most common group of antibacterial agents currently used in the Korean aquaculture industry and the amount of use has been increased steadily.

But the analysis method of the residual fluoroquinolones in farmed fish muscle is not well developed and the withdrawal time of following oral administration to secure food safety of farmed fish is not also clearly established under actual field conditions.

In this study, HPLC analysis method for the simultaneous determination of five fluoroquinolones, ofloxacin (OFL), pefloxacin (PEF), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP), and enrofloxacin (ENRO), in fish and shellfish was developed and the residuals of five fluoroquinolones in the farmed fish were monitored to verify the developed method. Withdrawal times of ENRO and CIP following oral administration were established in olive flounder, *Paralichthys*

olivaceus, under field conditions to secure food safety of farmed fish.

The optimized HPLC system for the simultaneous analysis of 5 fluoroquinolones were composed of 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 0.1M 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 and the flow rate was 1mL/min.

For extraction of fluoroquinolones, fish and shellfish muscle was homogenized with acetonitrile and mobile phase basic solution. And the mixture was heated at 80°C for 10min then centrifuged and evaporated after treatment of n-hexan to remove protein, lipid and low molecular weight pigments.

The retention time for each antibiotics was OFL, 23.3±0.15 min; NOR, 24.9±0.11 min; PEF, 26.0±0.09 min; CIP, 28.6±0.08 min and ENRO, 42.3±0.07 min and an interference phenomenon was not occurred. The detection limit of each component was 0.005 mg/kg for OFL and 0.001 mg/kg for the others.

The recovery of fluoroquinolones from fortified samples at the level of 0.05~0.5 mg/kg was 72~110% in olive flounder, 70~107% in eel and 72~96% in oyster. The accuracy and confidence of the analysis results of the developed method is high as Coefficient of variation (CV) value of the recovery test result is below 10%.

Fluoroquinolones have been detected in the most fish farms surveyed in the southern coastal area of Korea, especially ENRO and CIP was the most common agent. The range of detected concentrations of fluoroquinolones was 0~0.859 mg/kg in 70.3% of olive flounder, *Paralichthys olivaceus*, samples and 0~0.143 mg/kg in 48.1% of sea bass, *Lateolabrax japonicus*, samples but

detected concentrations was below 0.1 mg/kg of in black rock fish, *Sebastes Schlegeli*, and sea bream, *Pagrus Major*, samples.

Though fluoroquinolones was detected in the fish samples examined in all year round, the amount of usage was heavily increased during summer time, June to September. The monthly detection rate of fluoroquinolones in the farmed fish samples was 40% in April and increased as above 60% in August but decreased in September and October.

The maximum concentration of fluoroquinolones in the cultured oyster was 0.046 mg/kg but fluoroquinolones were detected in just 3.9% of the sampels. There was no seasonal and regional variation for the detection and only OFL and CIP were sporadically detected.

The farmed oliver flounders were fed a commercial mediated diet containing 5mg of ENRO per kg of fish for 9 days. For 6 days of medication period, the concentration of ENRO and its major metabolite, CIP was rapidly increased by the maximum value, 4.3 mg/kg and rapidly decrease for 15 days after medication then no changes till 50 days. But after 60 days the residual concentration was decreased below the maximum permissible concentration under Korean Food Sanitation Law, 0.1 mg/kg. Adequate withdrawal period of ENRO is identified as 60 days in the case of oral administration.

The farmed oliver flounders were fed a commercial mediated diet containing 5mg of CIP per kg of fish for 13 days. The concentration of CIP was continuously increased by the maximum value, 0.73 mg/kg and rapidly decrease for 6 days after medication below the maximum permissible concentration under Korean Food Sanitation Law, 0.1 mg/kg. Adequate withdrawal period of CIP is identified as 15 days in the case of oral administration.

I. 서 론

국민소득 증대와 소비수준 향상에 따라 식품에 대한 선호도 및 기호도는 개인의 건강에 대한 관심과 함께 점차 고급화 되어가고 있는 추세에 있다. 수산물은 고단백 저콜레스테롤의 식품으로서 건강 기능성분을 많이 함유하는 등 영양적으로도 대단히 우수할 뿐만 아니라 탁월한 국민의 기호성으로 날로 소비량이 증가하고 있다. 이러한 시대적 요구에 부응하여 1970년대부터 각종 어류에 대한 양식기술이 개발됨으로써 1980년대 이후 넙치, 조피볼락 등 고급어종을 중심으로 급속히 발전하여 육상수조식과 해상가두리의 규모가 기업형 양식으로 확대되고 있으며, 단일 집중화된 양식품종이 지역 특산품종의 양식과 함께 활발히 추진됨으로서 양식의 개발여건에 따라 양식 생산량도 급속히 증가하게 되었다(Heo 등, 2002; 김, 2001). 그러나 양식 생산기술의 진보에 따라서 어류의 고밀도 사육이 가능하게 되었지만, 연안양식은 산업화와 도시화에 의한 연안환경의 악화 그리고 장기간의 집약적 양식에 의한 어장노화, 양식품종의 열성화, 질병 발생 등 여러 가지 원인으로 양식생산성이 점차 떨어지는 경향을 보이고 있으며, 양식어류에 발생하는 질병의 예방 또는 치료를 위하여 다양한 수산용 의약품이 사용되고 있다(Heo와 Ko, 1996; Heo 등, 2002; Horie와 Nakazawa, 1995).

어류양식 산업에서 적절한 관리체제 없이 사용되는 각종 항균제는 약물의 오·남용으로 인하여 일차적으로는 치료 및 예방을 대상으로 하는 어류질병 원인세균의 약제 내성균을 증가시켜 어류질병의 치료가 어렵게 되어질 뿐만 아니라, 양식어류의 체내에 잔류하게 되어 식품위생학적으로는 물론 환경오염 등 인간의 건강을 위협하는 심각한 현안문제로 부각되고 있다(Heo 등, 1992; Lee와 Hong, 2004). 항균제가 잔류하는 식품을 지속적으로 섭취할 경우, 항균제가 인체에 직간접적으로 부정적인 영향을 미칠 수 있

다. 특히 quinolone계 항균제의 부작용으로는 오심, 복부불쾌감, 두통, 어지러움 등이 주로 관찰되며 그 외에 피부발진, 심장독, 광독성, 연골독성 등이 보고되고 있다(Stahlmann과 Lode, 1999; Choi 등, 2002; Wolfson과 Hooper, 1991). 또한 비록 어류질병 세균 등 인체에 병원성이 없는 세균이 항균제 내성을 가지게 되면 이러한 항균제 내성균이 인체내 또는 자연계에서 쉽게 인체병원균으로 항균제 내성이 전이될 수 있기 때문에 식품 중의 항균제는 반드시 관리되어야 할 식품위생 안전위해로 간주되고 있다(Hayama, 1998; Horie 등, 1995; Lee와 Shin, 1990).

이와 같이 어류질병세균의 또한 독성이나 내성균 출현 등 부정적인 요소가 사회적 문제로 크게 대두됨에 따라 소비 위축 심리가 유발하기 때문에 식품에서 항균제의 잔류는 1960년대부터 다양하게 논의되어오고 있다. 1980년대에 들어서 국제간 식품유통이 활발하여지게 됨에 따라 나라마다 각기 다른 잔류규제가 무역마찰과 식품위생상의 관점에서 중요시 되게 되었다(Horie와 Nakazawa, 1995). 즉 동물용 약품의 잔류 등에 관한 각국의 법규제가 달라 무역의 비관세 장벽이 되었다. 이와 같은 배경에서 국제식량농업기구(FAO) 및 세계보건기구(WHO)의 합동식품규격위원회 중에 새로운 잔류 동물용의약품규격분과(Codex Committee on Residues of Veterinary Drugs in Foods, CCRVDF)가 개설되고, 1986년 10월에 1회 총회가 개최되었다. 그 후 매년 미국에서 회의가 개최되어 잔류동물용 의약품의 국제규격의 검토, 특히 동물용의약품의 최대잔류기준치(Maximum Residue Limits, MRL)의 설정에 대해서 검토가 진행되고 있다. 또한 축·수산물중에 잔류하는 동물용의약품의 안전성 평가나 MRL의 규격원안의 작성에 대해서는 FAO/WHO 식품첨가물전문가위원회(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)에서 검토하고 있다.

항균제란 미생물이 생산하는 물질로 그것이 다른 미생물의 증식을 억제

하거나 죽여버리는 것으로서 수산용 의약품으로 사용되는 항균물질은 tetracycline계, aminoglycoside계, macrolide계 β -lactam계 및 quinolone계 등이 있으며, 현재 수산용 의약품으로는 9계열 30여종의 약품이 단독 또는 복합제로서 약 200여 제품이 제조 및 시판되어 현재 국내 어류양식장에서 사용되고 있다(동물용의약품등 편람, 2001). 동물용의약품협회의 우리나라 수산물 판매현황에 의하면 2005년에 수산용 항균제는 1200톤 정도 사용되고 있다. 이중 tetracycline계가 전체의 60% 정도로 가장 많이 사용되고 있으며, 다음이 penicillin계, quinolone계, chloramphenicol계의 항균제를 사용하고 있다. Quinolone계 중 70%가 fluoroquinolone계 항균제로 약 56톤 정도 사용되고 있으며, 매년 그 사용량은 증가하고 있는 추세이다. 우리나라에서 수산용 의약품으로 승인 받아 제조·판매하고 있는 fluoroquinolone계 항균제로는 ofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, ciprofloxacin 및 enrofloxacin 등이 있다. 이중 enrofloxacin은 제조 및 판매의 승인은 있으나 업계의 경제적인 이유로 인하여 수산용 의약품으로 제조되는 제품은 없다. 그러나 양식어장 및 동물용 약품판매처 등의 탐문조사결과 어류양식장에서는 돼지나 양계용의 동물용의약품으로 제조되어 판매되는 enrofloxacin 약제를 구입하여 어류질병의 치료에 사용하고 있는 것으로 확인되었다.

Quinolone 제제는 1962년에 nalidixic acid가 최초로 발견된 이래로 항균범위와 항균력을 개선하기 위하여 quinoline 기본구조를 가진 많은 합성물질이 만들어져, 25개 이상의 유도체들이 합성되어져 왔다(Precorelli 등, 2003). 초기에 개발된 quinolone제제로는 flumequine, oxolinixc acid가 있으며, 이들 제제는 이중 방향족(heteroaromatic), 이중환(bicyclinc)을 가지고 있는 화합물로 많은 호기성 세균에 대하여 우수한 활성을 가지나 혐기성 세균에 대해서는 다소 미약한 활성을 나타낸다(Seo 등, 2002). 이후 이들 제제의 효능을 개선하여 1979년 Pesson 등에 의해 quinolone의 6번 탄소위치에 불소(F)를

첨가함으로써 혐기성 세균에 대한 *in vitro*상의 활성이 증가된 3세대 quinolone인 fluoroquinolone계 항균제가 개발되었다(Lesher 등, 1992). Fluoroquinolone계는 서로 유사한 활성기인 pyridone carboxylic acid를 가지며 4-quinolone nucleus와 3번 위치의 carboxyl기를 공통으로 가지고 있다. 또한 6-fluoro와 7-piperazino기를 가지며 1-nitrogen 및 piperano기의 변화에 따라 다양한 유사구조를 가지고 있다. (Wolfson과 Hooper, 1985)

Fluoroquinolone계 항균제의 반응기작은 세균의 세포내로 침입하여 topoisomerase중 DNA gyrase와 topoisomerase IV와 반응함으로써 항균력을 발휘하는데 이 두가지 효소는 세균의 DNA복제시 중요한 역할을 한다. 이 효소의 정상적인 역할은 DNA 이중나선 구조를 절단하여 한쪽 strand로 또 다른 DNA가 복제 되도록 하고, 절단된 strand를 다시 이어주는 역할을 한다 (Kim 등, 2004; Wang, 1996; Kang 등, 1997).

Fluoroquinolone계 합성항균제는 sulfa제, β -lactam계, aminoglycoside계, tetracycline계, macroride계 항생물질에 내성을 가진 균주뿐만 아니라 그람 음성세균, 그람양성세균, Mycoplasma spp. 등에까지도 광범위하게 작용하고 (Posyniak 등, 1999), Sallmonella spp., Shigella spp., Yersinia spp., Vibrio spp., Aeromonas spp., Camphyobacter spp., Mycoplasma spp., Streptococcus pneumoniae는 물론 이미 penicillin에 대해 내성을 지니고 있는 균주에 대해서도 매우 강한 항균력을 지니고 있기 때문에 fluoroquinolone계는 sulfa제의 개발 이래 가장 중요한 항균물질 그룹으로 사람과 가축의 치료 및 예방약제로 폭넓게 사용되고 있다(Mitsuyama, 1999; Seo 등, 2002; Morales-Munoz 등, 2004).

Fluoroquinolone계 항균제 중에서 norfloxacin이 가장 먼저 미국 식품의약품안전청으로부터 판매허가를 받아 그 가치를 인정받게 되었고(Koga 등, 1980), 유럽에서는 1987년부터, 미국에서는 1989년부터 인체에는 전혀 사용

된 적이 없는 enrofloxacin이 동물용의약품으로 사용허가를 받았다(EMEA, 2002). 일본에서는 1991년 이후에 enrofloxacin, danofloxacin, ofloxacin, benofloxacin 등 fluoroquinolone계 항균제가 동물용의약품으로서 승인되었으며, 매년 사용량이 증가하여 왔고(Horie 등, 1995), ofloxacin, enoxacin, ciprofloxacin, pefloxacin 등의 fluoroquinolone계 항균제가 개발되어 1980년대 초기 수산용 항균제의약품으로서 적용여부가 시험되어(Heo와 Kim, 1994; Heo 등, 1998) 우리나라 어류양식 산업에 소개되면서, 어류의 세균성 질병의 예방 및 치료하는데 효과적으로 사용하고 있다(Son, 1999; Yun 등, 2003).

그러나 최근 들어 미국에서는 fluoroquinolone 저항성 *Salmonella*속 균(Herikstad 등, 1997)과 *Campylobacter* 속 균(Smith 등, 1999)이 검출되는 등 축산물 내 본 약물의 잔류로 인하여 약제내성균의 증가와 항균제의 식품잔류로 인한 내성 세균의 유발 독성 및 알레르기 등 공중보건학적 위해성이 제기되어 미국(FDA, 2003), 캐나다(Barry, 1993), 유럽(EMEA, 2002), 일본(Horie 등, 1994)등에서 규제가 강화되고 있는 실정이다.

Fluoroquinolone계 항균제의 식품내 잔류허용기준은 EU의 경우 danofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, marbofloxacin 및 sarafloxacin 등이 설정되어 있으며, 이중 수산물에서는 enrofloxacin 단독 또는 ciprofloxacin과의 합한 양으로 0.1mg/kg을 규정하고 있으나(EMEA, 2002), 우리나라, 일본, 미국 및 국제식품규격위원회(Codex Alimentarius, CODEX)에서는 아직까지 fluoroquinolone계에 대한 허용잔류기준치를 설정하고 있지 않은 실정이다. 그러나 일본에서는 식품중에서 fluoroquinolone계 항균제가 검출되어서는 안 되는 물질로 규정하고 있다.

한편, 2003년초에 우리나라에서 EU로 수출한 게맛살에서 ciprofloxacin이 검출된 바 있으며, 그 후 일본에서는 대만산 뱀장어와 우리나라에서 수출한 활넙치에서 enrofloxacin을 검출하는 등 국제적으로 항균제에 대한 분

석이 강화되어 수출에 문제가 발생하게 되었지만, 우리나라에서는 수산물에 대한 fluoroquinolone계 항균제의 허용잔류기준치 및 분석법 뿐만 아니라 정확한 사용 실태조차 파악되어 있지 않은 실정이었다. 그러나 최근 세계적인 항균제 관리에 맞추어 최근 국내에서도 enrofloxacin 및 ciprofloxacin에 대한 분석법과 식품잔류허용기준치를 설정하였다(식품의약품안전청 고시 제 2006-15호). 이 규정에 따르면 수산물 중의 enrofloxacin 및 ciprofloxacin의 기준치는 두 성분을 합한 양으로 0.1 mg/kg 이하로 규정하고 있다.

항생물질 및 항균제의 종류의 다양성 및 그들의 활성에 따른 구조적 다양성들로 인해 법령시행에 따른 이들 물질들을 축·수산물로부터 정밀한 정성, 정량법이 필요하게 되었다. 일반 식품중에서 quinolone계를 비롯한 fluoroquinolone 항균제를 분석하는 방법으로는 스크리닝법으로서 미생물학적인 분석법(Microbial Inhibition Assay, MIA)과 효소면역측정법(Enzyme Immuno Assay, EIA), 박층크로마토그래피법(Thin Layer Chromatography, TLC), 액체크로마토그래피법(High Performance Liquid Chromatography, HPLC), 액체크로마토그래피 질량분석기법(Mass Spectrometry)법 등이 있으며, 이 중 가장 일반적으로 사용되는 규제검사 방법은 HPLC법이다.

미생물학적인 방법(Bogaerts와 Brussels, 1980; Son 등, 1999)은 고전적인 방법이고 정밀 정확성에선 다소 문제가 있으나, 동시에 다량의 시료를 다룰 수 있다는 점, 그리고 유관 화합물 중에서도 항생 항균효과가 있는 물질들을 탐지해낼 수 있는 점, 또 그들 대사산물 중에서도 항균효과를 가지고 있는 물질들을 탐지해 낼 수 있는 여러 가지 장점들이 있지만, 실험기간이 상대적으로 길며, 금속이온과 시료매질에 있는 다른 물질들에 의해 생물활성에 영향을 받는 등의 단점도 있다(Meetschen와 Petz, 1990; Smither, 1978). 그러나 검사비용이 저렴하고 특별한 장비가 필요 없기 때문에 지금까지 고효율적인 스크리닝방법으로 공공검사법에 사용되고 있다(Lee와 Hong, 2004).

면역학적 검사법은 일반적으로 임상진단분야에서 광범위하게 사용되어 오고 있다. 최근에는 식품내 잔류유해물질 검사에도 사용되고 있으며, 이 방법은 검사대상 물질에 대한 특이항체를 사용하여 효소 또는 형광반응성으로 측정한다(Son, 1999).

TLC법은 시간과 용매의 소비량이 많고 추출 및 정제과정이 복잡하고 검출감도가 낮은 단점이 있다(Juhel과 Abjean, 1998).

액체크로마토그래피 질량분석기(Mass spectrometry)는 고가의 장비이고 유지비용이 많이 요구되고 있으나, 생물시료에서 약품과 대사산물의 미량 성분에 대한 정량 및 구조 정보를 얻는데 매우 효과적이기 때문에 이 기기에 의한 방법도 이용되고 있다(Lee와 Hong, 2004).

HPLC 분석법은 식품내에서 quinolone계 및 fluoroquinolone계 항균제의 분리분석에 최적의 방법으로 사용되고 있으며 적용대상이 넓고 감도도 우수하여 최근 이 HPLC 기기를 이용하여 항균물질 잔류검사법이 활발히 연구개발 되고 있으며(Yorke와 Forc, 2000; Gigosos 등, 2000; Espinosa-Mansilla 등, 2006), 특히 농·축·수산물의 수출입시 발생될 수 있는 무역마찰에 대비한 정확하고 과학적인 자료의 제공 및 정확한 정성 정량을 목적으로 HPLC를 이용한 기기 분석법들이 제안되어 있다.

일본을 비롯하여, 노르웨이, 덴마크 등에서도 양식 수산물에서의 항균제 잔류 모니터링 및 어종별 휴약기간 설정을 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이에 따라 분석법이 개량되고 있다(Ellingsen 등, 2002; Skjølstrup 등, 2000; Horie 등, 2003; Ueno, 1999; Rigos 등, 2003). HPLC 등 기기를 사용하는 분석방법을 이용하기 이전에는 특정한 미생물 균주를 이용하여 그 잔류량을 분석하므로 검출감도가 상당히 낮았다. 그러나 최근 분석기술의 급속한 발달에 따라 ppb 또는 ppt 수준까지 화학물질을 검출하는 것이 가능하게 되었다. 따라서 수산식품 중에서 약물의 잔류를 방지하기 위해서는 검사체

제의 정비가 매우 중요한 것으로 생각된다.

현재까지 어류 중에서 fluoroquinolone계 항균제의 정확한 분석방법과 사육수온 변화에 관련된 어체내에서의 fluoroquinolone계 항균제의 체내흡수, 분포, 배설 등 약물사용방법 설정에 필수적이라 할 수 있는 임상약물 동태에 대한 연구가 수반되어 있지 않고, 항온동물인 가금류 및 포유류를 대상으로 한 연구결과에 의존하고 있는 실정이다(Kim 등, 2002). 수산물에서는 어류의 혈청을 대상으로 분석하는 방법(Jo, 2003; 정 등, 2000)이 일부 개발되어 있으나, 어류 및 패류 등 수산식품을 대상으로 개발된 경우는 그다지 많지 않다. 축산물을 대상으로 개발된 시험방법으로 수산물을 분석할 경우 저분자물질 또는 색소와 같은 방해물질 등에 의하여 정확한 분석이 되지 않는 것으로 본 연구에서 확인되었으며, 또한 수산물을 대상으로 한 몇몇의 분석방법도 기기분석에서 가장 중요한 부분을 차지하고 있는 회수율에서 문제점이 있는 것으로 확인되었다.

따라서 본 연구는 수산용 의약품으로 승인 되어 제조 판매되고 있는 5종의 fluoroquinolone계 항균제, 시프로플록사신(ciprofloxacin, CIP), 노플록사신(norfloxacin, NOR), 엔로플록사신(enrofloxacin, ENRO), 페플록사신(pefloxacin, PEF), 오플록사신(ofloxacin, OFL)에 대해서 기존의 연구자들의 방법을 적절히 수정 개량하여 간편하면서도 회수율을 높이고, 5종을 동시에 분석이 가능한 방법을 확립하고자 하였다. 또한 어류양식 중에 사용된 항균제에 대한 식품위생학적 안전 확보의 필요성이 제기됨에 따라 우리나라 연안해역에서 양식중인 어류의 fluoroquinolone계 항균제 잔류 실태를 파악하였다. 그리고 우리나라에서 양식 생산량이 가장 많은 넙치를 대상으로 엔로플록사신과 시프로플록사신의 적정 휴약기간을 구명하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시약

표준품으로 사용한 fluoroquinolone계 항균제 5성분 중 ciprofloxacin (CIP), enrofloxacin (ENRO), pefloxacin (PEF), ofloxacin (OFL) 등 4성분은 Dr. Ehrestorfer GmbH(Germany)사 제품을 사용하였고, norfloxacin (NOR) 1성분은 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.

2. 시험분석장비

본 실험에서는 HPLC(Shiseido nanospace, Japan)를 사용하여 fluoroquinolone계 항균제를 분석하였다. 그리고 시료 전처리에는 homogenizer (Polytron PT 3000, Switzerland), 원심분리기(Hanil supra 21k, Korea), 감압농축기(EYELA N-2NW, Japan) 및 syringe filter(Sartorius, Japan) 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 0.20 µm, minisart SRP 15, Sartorius, Germany)는 시료 전처리 과정에서 사용하였다.

HPLC system은 UV 및 형광검출기가 장착된 Shiseido nanospace SI-2 HPLC system(Shiseido Co. LTD, Japan)을 사용하였고, column은 C₁₈(Shiseido UG-120, 4.6 mm I.D×250 mm) 그리고 data system은 SCM21(Ver. 5.0, Shiseido Co. LTD, Japan)를 사용하여 분석하였다.

3. 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 분석

1) 표준용액 제조

Fluoroquinolone계 항균제는 OFL, NOR, PEF, CIP, ENRO 표준품을 10 mg씩 정량하여 0.1 N NaOH를 소량 가하여 녹인 후 100 mL 용량 플라스크에 methanol로 정용(100 mg/kg)하였으며 working solution은 매 실험 때마다 조제하여 사용하였다.

2) 이동상 조제

Fluoroquinolone계 항균제를 분리하기 위하여 이동상의 조성을 검토하였다. 즉 acetonitrile과 phosphoric acid(pH 3.5)의 적당한 비율로 retention time을 조정한 후 phosphoric acid 농도, acetonitrile 비율, pH, column 온도 순으로 최적조건을 선택하였다.

3) 플루오로퀴놀론계 항균제의 최대흡수파장 선정

수산용 fluoroquinolone계 항균제의 최대 흡수파장을 조사하기 위하여 photodiode array detector를 이용하여 UV 220~400 nm의 파장에서 흡수 spectrum으로부터 최대 흡수파장을 구하였다. UV 검출기와 형광검출기를 비교하여 형광검출기에서의 최대 peak를 나타낸 Ex 280 nm와 Em 450 nm에서 fluoroquinolone계 항균제를 측정하였다.

4) 표준곡선의 작성

Fluoroquinolone계 항균제 표준용액(10mg/kg)을 각각 10 mL 용량플라스크에 2, 1, 0.5, 0.2, 0.1 mL씩 취하고 이동상으로 표시선까지 채워 최종농도가 2.0, 1.0, 0.5, 0.2, 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 이 되도록 희석하였다. 5개 농도의 희석된 표준용액 CIP, NOR, PEF, OFL 및 ENRO은 20 μL 씩 3회 반복 주입하여 얻은

크로마토그램으로부터 각각의 fluoroquinolone계 항균제에 대한 농도별 평균 면적을 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 크로마토그램으로부터 각 성분에 대하여 retention time이 일치되는 각각의 피크에 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.

5) 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 추출 조건

어패류에서 fluoroquinolone계 항균제를 추출하기 위한 전처리 과정은 Nagao 등(1998)의 방법을 응용하였는데, 추출용매 및 추출조건은 예비실험을 통하여 선정하여 Fig. 1과 같이 추출하였다. 즉, 어류의 껍질을 벗긴 후 필렛을 뜬 어육을 잘게 마쇄하여 시료를 조제한 다음, 어육 시료를 5g 취하여 phosphoric acid 및 acetotitrile 그리고 tetrahydrofuran을 혼합한 이동상과 acetonitrile을 1:1로 섞은 혼합액 40 mL를 가하여 호모게나이저(Polytron PT 3000)로 2분간 균질화시켰다. 이 균질액을 80℃에서 수욕중에서 10분간 증탕으로 열처리하여 단백질을 석출시킨 다음 방냉하여 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 단백질을 제거하였다. 단백질을 제거한 상정액을 50 mL 분액여두로 옮겨 헥산 50 mL 가하여 조용히 흔들어서 지질을 제거하고 그 하층액(추출액)은 1-propanol 10 mL을 넣어 40℃에서 건고시까지 감압 농축하였다. 이 건고물을 이동상 2.5 mL을 가하여 충분히 용해시킨 다음 0.2 μm 여과지(PTFE, Millipore, USA)로 여과한 후, HPLC로 분석하였다.

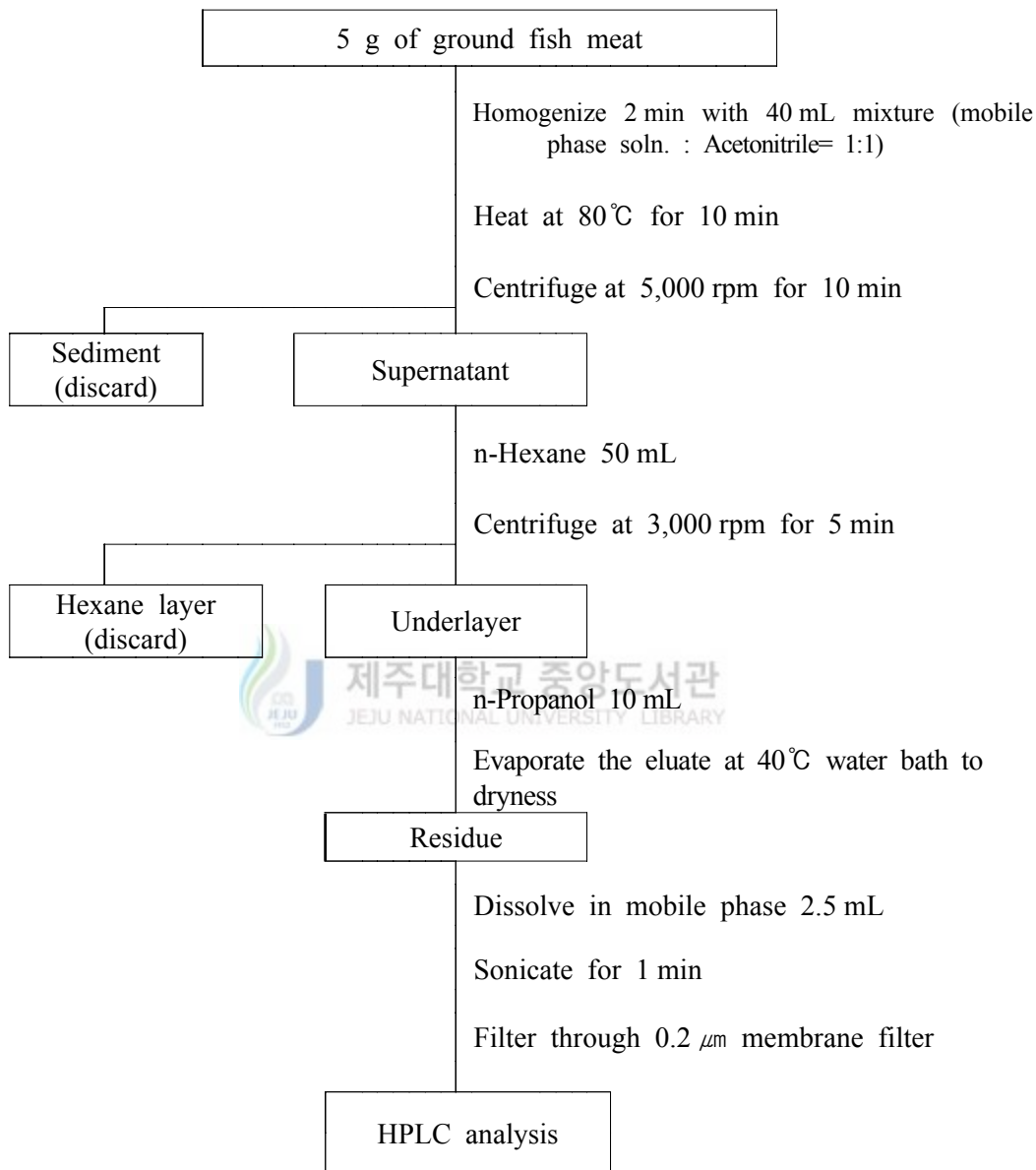


Fig. 1. Extraction and clean up procedures for the analysis of fluoroquinolones in the fish and shellfish muscle.

6) 회수율 측정

Fluoroquinolone계 항균물질의 정량을 위한 표준곡선 작성에는 구입한 표준품(순도 98%이상)을 사용하였으며, 넙치, 새우, 뱀장어 및 굴에 대한 fluoroquinolone계 항균물질 5종의 농도별 회수율을 구하기 위한 전처리 과정은 다음과 같다. 어패류 육 5 g을 잘게 다져서 최종 항균물질 농도인 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.5 mg/kg이 되도록 미리 계산하여 이동상에 녹인 후 균질화하고, 항균물질이 충분히 조직속으로 스며들도록 30분에서 60분간 상온에 방치 하여 시료 전처리와 같은 조작을 통하여 fluoroquinolone계 항균물질을 추출한 다음 HPLC로 분석하여 회수율을 측정하였다.

7) 검출한계의 측정

5종의 fluoroquinolone계 항균제의 표준물질을 각각 0.2, 0.1, 0.001, 0.005, 0.0001 mg/kg의 농도로 methanol에 녹여서 제작하였다. 이들 항균제를 위의 HPLC 분석 조건에 적용하여 검출한계를 측정하였다. 검출한계(Detection limit)는 시각적 평가에 근거하는 방법에 따라 기지량의 분석대상물질을 함유한 검체를 분석하고 그 분석대상물질을 확실히 검출할 있는 최저의 농도를 확인하는 것으로 결정하였다. 정량한계(Quantitation limit)는 적절한 정밀성과 정확성을 가진 정량값으로 표현할 수 있는 검체중 분석대상물질의 최고량을 말한다. 본 연구에서는 시그널대 노이즈에 근거하는 방법으로 검출한계를 정하였으며, 정량한계는 검출한계의 2배로 하였다(Son, 1999).

4. 양식어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류 실태조사

1) 어패류양식장의 선정

시험에 사용한 양식어류는 우리나라의 양식산업이 발달한 부산, 통영, 거제, 여수, 완도 및 제주지역 등 6개 지역에서 해상 및 육상어류양식장 선정하여 2004년 5월부터 2005년 10월까지 양성중인 어류를 채취하였다. 어류양식장은 각 지역의 양식 환경 및 지리적 특성을 고려하여 부산시 및 경남 통영시 1개 어장, 거제시, 전남 여수시, 완도군 그리고 제주도에 각 2개 어장을 대상으로 하였다.

부산시 기장군에 위치한 시험어장은 넙치만을 생산하는 육상어류양식장으로 사료는 주로 까나리 및 잡어의 생사료를 배합사료와 혼합하여 습사료를 현장에서 제조하여 사용하고 있었다. 항균제 등의 약제 사용에 대한 관리일지는 없으며, 항균제 사용 이력에 대한 탐문조사결과 테트라사이클린계열 항생제는 전혀 사용하지 않았지만, CIP을 사용한 이력이 있다고 하였다. 경남 통영시 산양읍에 위치한 시험어장은 0.5 ha 정도의 소규모의 해상어류양식장으로 참돔을 비롯하여 조피볼락, 감성돔 및 돌돔 등을 양식하고 있으며, 항균제 등의 약품사용에 대한 관리일지는 없었다. 거제지역의 시험어장은 육상어류양식장과 해상어류양식장을 대규모로 운영하는 기업형태의 양식어장이다. 질병관리사가 어류의 질병과 약제 사용일지 등의 관리기록을 유지하고 있었다. 전남 여수시 및 전남 완도군의 시험어장은 0.5 ha 정도의 소규모 해상어류양식장으로 조피볼락, 농어 등을 양식하고 있다. 항균제는 어체에 상처가 생기면 즉시 사용하는 편이나, 약품의 사용일지는 없었다. 제주지역은 북제주군 소재 육상어류양식장 2개소를 대상으로 항균제 잔류실태조사를 실시하였지만, 항균제 등의 약품관리기록은 없었다.

한편, 어류양식장에서 사용하는 항균제의 영향을 파악하기 위하여 우리나라 남해안의 통영일원에 위치한 수출용 패류생산 지정해역 및 주변해역

의 패류에 대해서 fluoroquinolone계 항균제 오염실태를 2005년 1월부터 12월까지 매월 1회씩 조사하였다.

2) 대상어패류

부산시, 거제시 및 완도군에서 각각 1개소 그리고 제주시에서 2개소의 육상어류양식장을 선정하여 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 대상으로 조사하였으며, 통영시의 해상어류양식장에서는 참돔(*Pagrus Major*), 조피볼락(*Sebastes Schlegeli*)을 대상으로 조사하였으며, 여수시의 해상어류양식장은 조피볼락 및 농어(*Lateolabrax japonicus*)를 대상으로 OFL, NRO, PEF, CIP 및 ENRO 등 5성분의 fluoroquinolone계 항균제를 분석하였다. 시험에는 넙치 135마리, 조피볼락 72마리, 농어 54마리 그리고 참돔 18마리 등 총 279마리의 양성중인 어류를 사용하였다(Table 1). 또한 거제, 통영, 여수, 완도 및 제주에서 생산되어 출하되고 있는 넙치 92마리 및 조피볼락 57마리에 대해서도 모니터링 하였다.

통영일원의 수출용 패류생산 지정해역의 13개 굴 양식장과 주변해역의 해상어류양식장 시설에 진주담치가 부착한 2개 지점을 각각 선정하여 모니터링하였다.

Table 1. Number of fish samples collected at the surveyed fish farms

Samples	Olive flounder	Black rock fish	Sea bass	Red sea bream	Total
Busan	27	0	0	0	27
Geoje	27	0	27	0	54
Tongyeong	0	27	0	18	45
Yeosu	0	27	27	0	54
Wando	27	18	0	0	45
Jeju	54	0	0	0	54
Total	135	72	54	18	279

5. 수산용 동물의약품에 대한 양식어류의 휴약기간 설정

1) 실험어

2005년 4월에 여수지역의 육상어류양식장으로부터 양식중인 400 g 전후의 질병이 없는 넙치(olive flounder, *Paralichthys olivaceus*)를 약 200마리 구입하여 남해수산연구소 양식 시험동에 있는 원형 콘크리트 수조(지름 4.7 m, 38톤형 둥근 콘크리트 수조)에서 1개월 정도 순치시킨 후 ENRO를 경구투여하면서 경시적으로 채취하여 시험어로 사용하였다. 또한 2005년 8월부터 전남 해남군의 상업적인 어류양식장에서 400 g 전후의 넙치 약 300마리가 수용되어 있는 3개의 양식수조(5×5. m의 사각 콘크리트수조)에서 양식중인 넙치에 1차 시기와 같은 ENRO를 경구투여하였고, CIP은 2개의 제약회사의 제품을 구입하여 제품에 명시된 용량에 따라 사료에 혼합한 후 경구투여하면서 경시적으로 채취하여 시험어로 사용하였다.

2) 항균제 투여방법

ENRO(수용액, 1 L 중 100 g의 ENRO 함유)은 일일 섭취량이 어체중 kg당 5 mg이 되도록 생사료와 혼합한 습사료를 제조하여 매일 1회씩 9일 동안 경구투여하였으며, CIP(수산용 시프로틸-50 및 씨프틸-50은 1kg 중 50 g의 CIP 함유)은 일일 어체 섭취량이 어체중 kg당 CIP으로서 5 mg이 되도록 생사료와 혼합한 습사료를 제조하여 매일 1회씩 13일 동안 경구투여하였다.

3) 시료채취

ENRO를 경구투여 중에는 0, 3, 6, 9일 간격으로 시험어를 채취하였으며, 경구투여 종료 후에는 일반 사료를 투여하면서 3-10일 간격으로 100일 동안 경시적으로 매회 7마리씩 채취하였다. 채취한 시료어는 즉살 시켜 실험실로 운송하여 근육을 채취한 후 즉시 분석하였다. CIP은 경구투여 중에

는 0, 3, 6, 9, 11, 13일 간격으로 시험어를 채취하였으며, 경구투여 종료 후에는 일반 사료를 투여하면서 3-5일 간격으로 30일 동안 경시적으로 항균제가 검출되지 않을 때까지 지속적으로 매회 7마리씩 채취하였다. 채취한 시료어는 즉살 시킨 후 실험실로 운송하여 근육을 채취하여 즉시 분석하였다.

4) 통계처리에 의한 휴약기간 계산

경구투여 및 휴약기간 동안의 근육 중 잔류량의 평균값 유의성($p < 0.05$) 검정과 수온이 투약 및 휴약기간에 미치는 영향 등을 SAS 프로그램으로 분산분석표(analysis of variance table : ANOVA table)를 작성하여 Duncan의 다중범위 검정(Duncan's multiple range test)으로 $p < 0.05$ 에서 결과간의 유의성을 검정하였다. 또한 휴약기간동안의 잔류량 감소곡선은 회귀방정식을 이용하여 구하였다.



III. 결과 및 고찰

1. 어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 분석방법 개발

1) 최적 분석조건

식품 중에서 fluoroquinolone계 항균제를 동시분석하기 위한 시도는 여러 연구자들에 의하여 시도되어 왔다. 이들 대부분의 연구는 축산물의 근육이나, 혈청을 분석하는 방법으로 수산물에 적용하기에는 색소나 저분자 화합물 등이 방해물질로 작용하여 정밀 분석에 어려움을 갖게 하였다. 본 연구에서는 축산물이나 어류의 혈청으로부터 quinolone계 항균제를 분석한 Gigoso 등(2000), Yorke와 Froc(2000), Jo (2003), Sim 등(1998) 및 Espinosa-Mainsilla 등(2006)의 조건을 참고하여 수산물에 잔류하는 5종의 fluoroquinolone계 항균물질 즉, 오플록사신(ofloxacin, OFL), 노플록사신(norfloxacin, NOR), 페플록사신(pefloxacin, PEF), CIP(ciprofloxacin, CIP) 및 엔로플록사신(enrofloxacin, ENRO)을 동시에 분석할 수 있는 최적분석조건 및 방법을 구명하였다.

(1) 측정파장의 선정

Fig. 2는 fluoroquinolone계 항균제 5성분의 표준용액을 0.1 M phosphoric acid : acetonitrile (91 : 9)를 이동상으로 희석하여 220~400 nm 사이에서 각 항균물질들의 자외부 흡수 spectrum을 나타낸 것이다. 각 성분들은 각각 OFL 293 nm, NOR 280 nm, PEF 280 nm, CIP 280 nm 및 ENRO 280 nm에서 최대흡수파장을 나타내어 UV검출기의 검출파장을 280 nm로 선정하여 fluoroquinolone계 항균제 표준용액의 동시분석을 위한 분석조건으로 하였다.

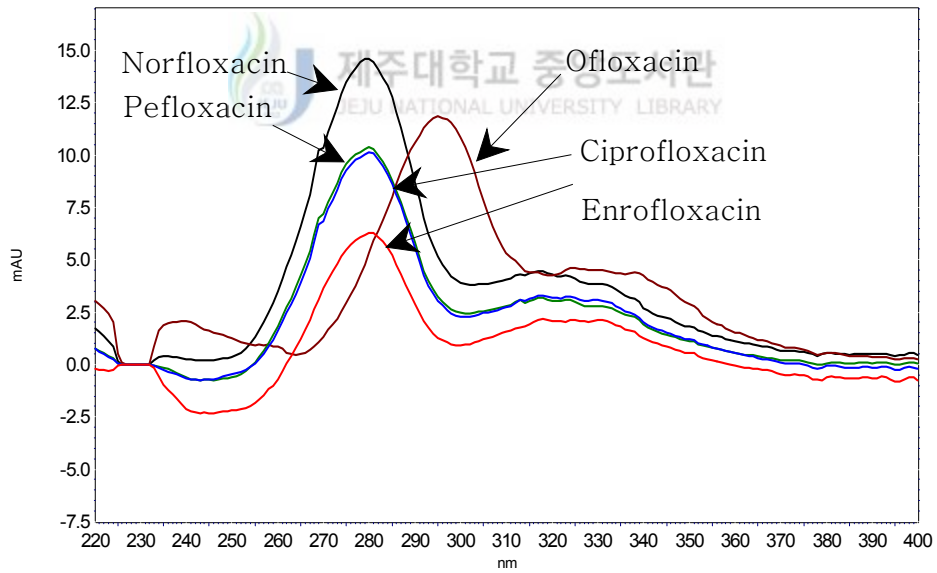
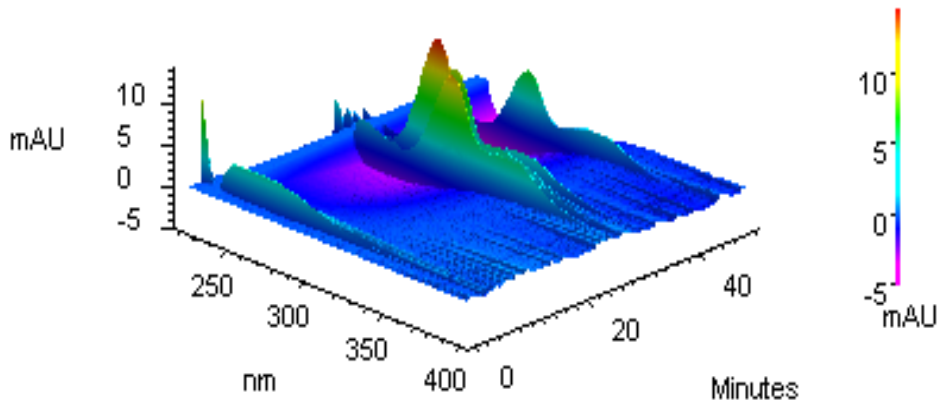


Fig. 2. UV absorption spectra of five fluoroquinolones.

(2) 이동상의 검토

합성항균제의 동시 분석 시 흔히 이용되고 있는 이동상 용매중의 유기 용매는 methanol과 acetonitrile이고 완충용액으로는 phosphoric acid, acetic acid, oxalic acid, sodium acetate, citric acid등이 주로 사용되고 있는데 유기용매와 완충용액의 비율은 분석하고자 하는 합성항균제의 종류와 특성에 따라 각각 달리하고 있다. Horie 등(1992)에 quinolone계 항균제를 분석을 위하여 역상크로마토그래피에서 많이 이용되고 있는 물-acetonitrile계 및 인산염 완충액-acetonitrile계를 이용해서 분리조건을 검토한 결과 인산 완충액-acetonitrile계를 이용한 쪽이 tailing을 보다 효과적으로 억제할 수 있었다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 동물용의약품 중 수산용 항균제로 판매되고 있는 OFL, NOR, PEF 및 CIP과 수산용 의약품으로는 제조 판매되지 않고 있지만, 일반 어류양식장에서 많이 사용하고 있는 것으로 확인된 ENRO를 동시에 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 기존의 축육이나 가금류에 적용하였던 방법들을 기초로하여 분석방법을 개발 하였다. Gigosos 등(2000)의 이동상 조건을 초기 조건으로 하여 acetonitrile의 농도, pH의 변화, phosphoric acid의 농도와 column의 온도 변화에 따른 이동상 용매들의 peak 분리 양상으로부터 이동상 조성을 선택하였다. 각 항균물질 0.1~1.0 mg/kg 표준용액으로부터 분리 실험을 통하여 각각의 분석조건을 구명하기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다.

Gigosos 등(2000)이 제시한 0.1M orthophosphoric acid(pH 3.5)와 acetonitrile (85:15, v/v)의 이동상을 1 mL/min의 속도로 분리하였을 때 CIP, NOR 및 ENRO의 3종 항균제에 있어서는 peak의 분리도가 아주 양호하였지만, 11.29분의 OFL과 11.24분의 CIP peak가 겹쳐져 나왔으며, NOR과 PEF도 약 30초 간격으로 분리되어 fluoroquinolone계 항균제 5성분을 동시에 분석하는 것은 불가능하였지만(Fig. 3), 이동상의 pH, phosphoric acid의 농도 및

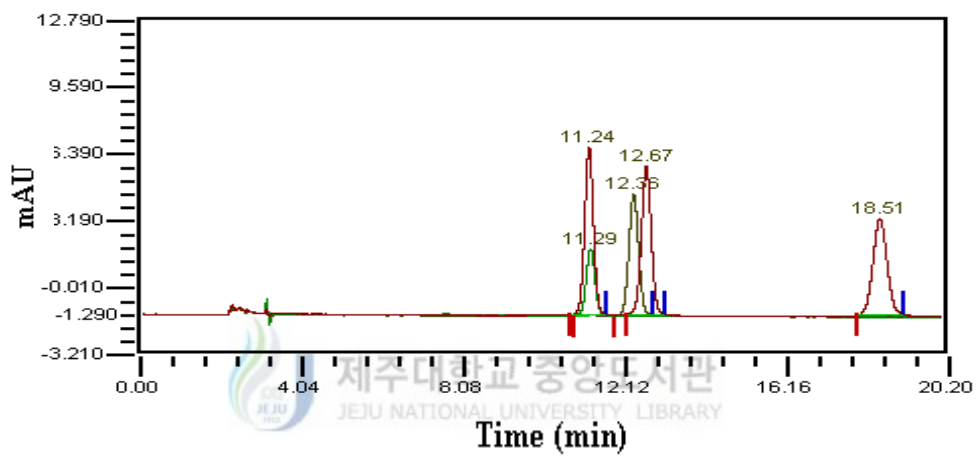


Fig. 3. Chromatogram of fluoroquinolones used by the method of Gigoso et al..

acetonitrile의 혼합비율 등의 조건을 조정·검색하면 fluoroquinolone계 항균제 5성분을 동시에 분석하는 것이 가능할 것으로 판단되었다.

Fluoroquinolone계 항균제는 분자구조상 산성과 염기성의 작용기를 가지고 있기 때문에 HPLC 칼럼의 고정상에 있는 free silanols와 결합하여 분석 시 약간의 tailing 현상이 나타난다. 이는 HPLC의 분석시 이동상의 pH가 이 체계의 분리에 영향을 주기 때문인 것이라 해석하고 있다(Barbosa 등, 1998). 따라서 이동상의 pH는 5종의 fluoroquinolone 항균물질을 크로마토그램에서 정확하게 분리할 수 있는 중요한 인자로 판단되었다. 본 실험에서는 pH 변화에 따른 이동상 용매들의 peak 분리양상과 항균물질의 동시분석시 적절한 피크분리를 위하여 phosphoric acid의 pH를 각각 pH 2.0, pH 2.5, pH 3.0, pH 3.5로 조절하여 acetonitrile과의 혼합비율을 90:10으로 하여 항균제의 피크 분리양상을 비교한 결과 pH 2.5에서 분리한 피크가 가장 양호한 분리능을 나타내었다(Fig. 4).

인산 농도를 0.01M, 0.05M, 0.1M로 하였을 때 0.01M의 농도에서는 OFL, NOR, PEF 및 CIP가 13.43분에서 15.96분 사이에 검출되어 4개 성분을 완전히 분리할 수가 없었으며, 0.05M의 농도에서도 OFL, NOR 및 PEF의 3성분의 peak가 16.25분에서 17.62분 사이에 겹쳐져 항균물질의 정확한 분리가 불가능하였다. 그러나 0.1M 인산농도에서는 완전하지는 않았지만, 5개 성분을 검출이 가능하였기 때문에 적절한 인산농도는 0.1M로 결정하였다(Fig. 5).

0.1M 인산과 acetonitrile의 혼합비율을 각각 90:10, 91:9, 92:8로 조정 한 후 분석한 chromatogram의 retention time을 비교한 결과는 Fig. 6와 같다. 0.1 M phosphoric acid와 acetonitrile의 혼합비율을 90:10로 조정 한 경우는 OFL, NOR 및 PEF의 retention time이 16.75분에서 18.22분까지 완전히 분리되지 않았으며, 92:8 조성에서는 NOR 및 PEF의 peak가 분리되지 않았다. 그러나 91:9의 조성에서는 5성분의 peak가 완전히 분리되어 이것을 혼합비율로 결정하였다.

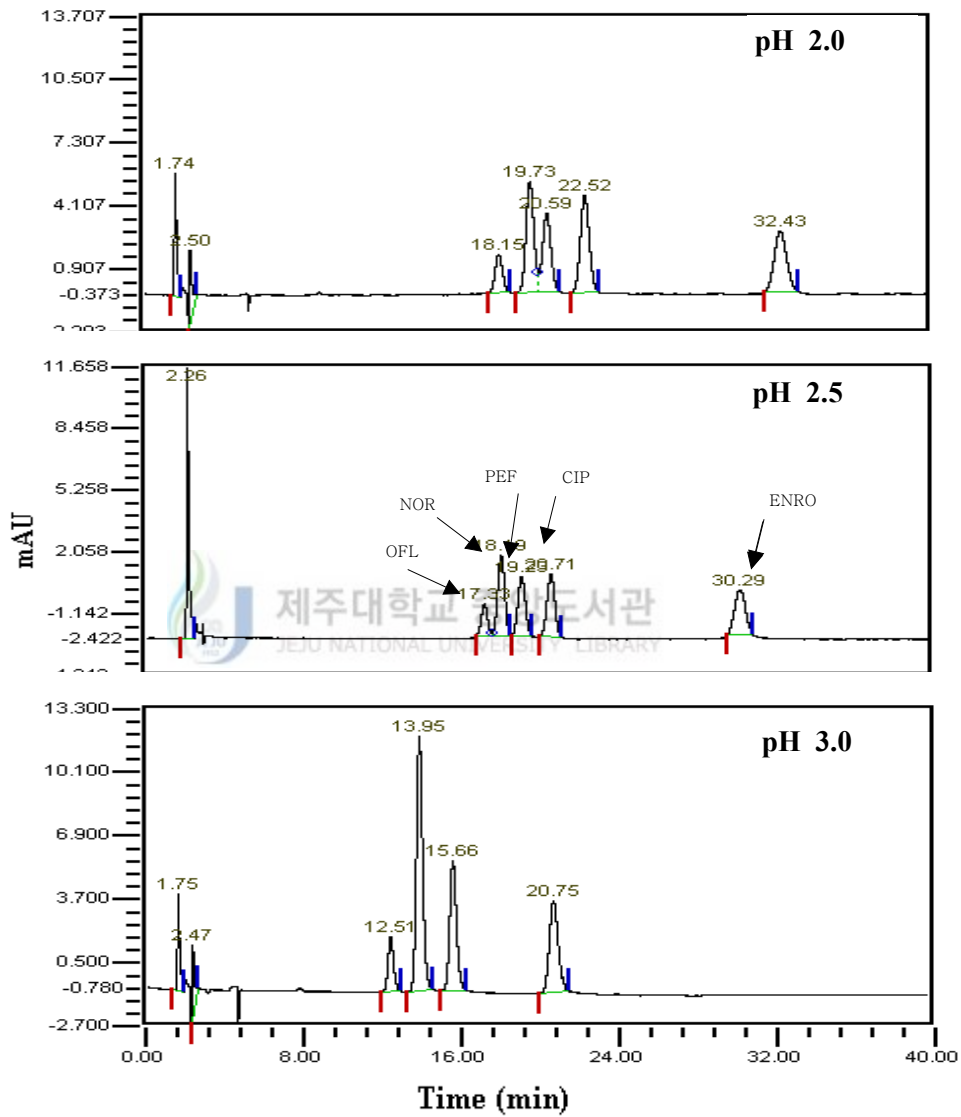


Fig. 4. Chromatograms of fluoroquinolones at various pH of phosphoric acid. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

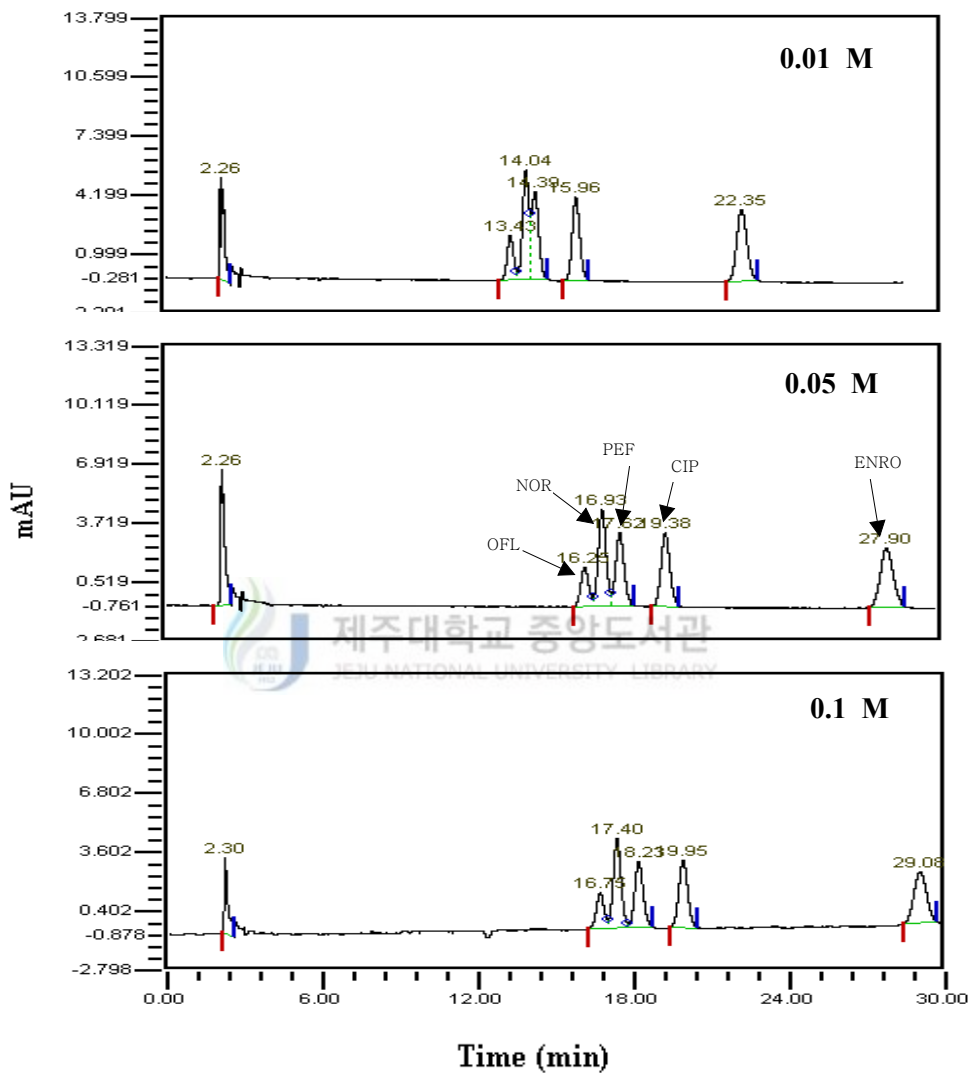


Fig. 5. Chromatograms of fluoroquinolones at various concentrations of phosphoric acid. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

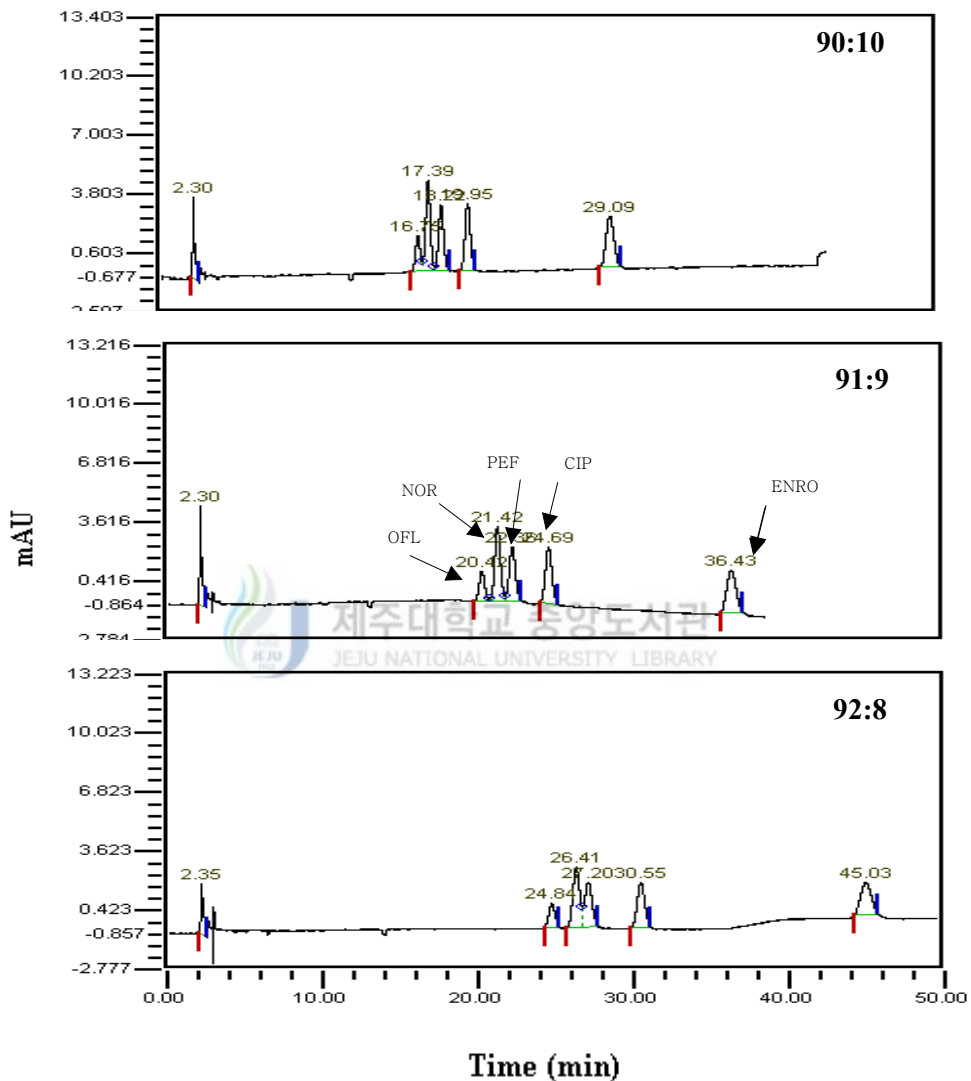


Fig. 6. Chromatograms of fluoroquinolones at various ratio of 0.1 M phosphoric acid to acetonitrile. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

Maraschillo 등(2001)은 이동상을 산성으로 조절하고 amine modifier인 trifluoroacetic acid를 이용한 이동상으로 동일계열의 fluoroquinolone계 제제인 OFL의 분리도가 개선됨을 보고하였으며, Samanidou 등(2003)도 산성과 acetonitrile, chloroform의 이동상을 이용해 ENRO, NOR, OFL, CIP의 분리도가 양호함을 보고하였다.

본 연구에서는 0.1M 인산과 acetonitrile의 농도를 91:9로 조정한 후 NOR과 PEF의 peak형태와 완전한 분리가 되는 chromatogram을 얻기 위하여 tetrahydrofuran (THF)을 이동상에 첨가하여 분석하였다(Fig. 7). 이동상 L당 THF를 3mL, 5mL 및 10mL를 각각 첨가한 후 각 항균제의 retention time을 비교한 결과, THF를 첨가하여 분석한 chromatogram에서 각 항균제의 분리도가 현저하게 향상되는 것을 확인하였다. 그러나 THF를 10 mL/L을 첨가하였을 때는 각 항균제들의 분리는 명료하게 이루어졌지만, ENRO가 검출되지 않았으며, 16.1분대에서 NOR와 PEF의 peak가 겹쳐져 나왔고, 3mL/L 첨가하였을 때는 OFL, NRO, PEF의 3개 peak의 분리가 완전하지 않았다. 그러나 THF를 5 mL/L을 첨가하였을 때에는 각 성분의 peak가 명료하게 분리되는 chromatogram을 얻을 수 있었다.

(3) 검출기의 선택

Fluoroquinolone계 항균물질은 280 nm에서 강한 흡수를 가지고 있지만, 형광성을 나타내는 화합물이기도 하다. 형광검출은 UV검출에 비해서 선택성이 우수하고 동시에 고감도 검출이 가능하다. 일반적으로 형광물질의 형광광도는 형광물질을 용해하는 용액의 pH에 강한 의존성을 나타낸다고 알려져 왔다(Horie 등, 1997). Gigosos 등(2000)도 278 nm의 UV에서 fluoroquinolone계 항균제를 검출하였으나, Yorke와 Froc(2000)은 UV검출기 보다는 형광에서 깨끗한 chromatogram을 나타낸다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 지금까지 만들어 낸 최적 이동상 조건을 바탕으로 기존의 연구자들의 구명하여 놓은 형광검출기와 ($E_m=450$ nm, $E_x=280$ nm)과 UV (278 nm)

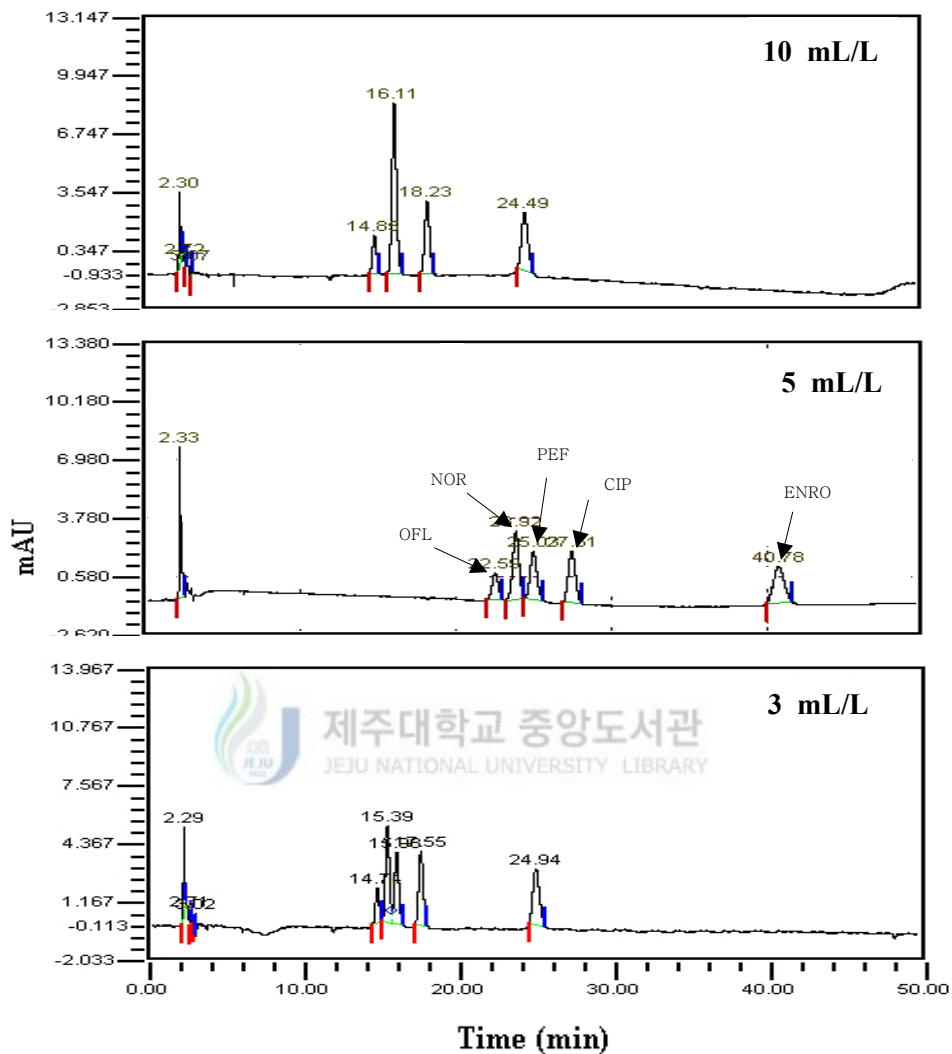


Fig. 7. Chromatograms of fluoroquinolones by THF amount. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

검출기의 chromatogram을 비교하여 Fig. 8에 나타내었다. 그 결과 UV 검출기 보다는 형광검출기를 사용하는 쪽이 협잡물의 retention time에 영향을 받지 않고 깨끗한 peak를 얻을 수 있었고, 또한 peak 면적비로 비교하였을 때에도 약 5배의 높은 감도를 나타내어 5종의 fluoroquinolone계 항균제를 동시에 분석 정량하는 것이 가능하였다.

(4) 플루오로퀴놀론계 항균제의 최적분석 조건

이상과 같이 이동상의 조건 등을 통하여 OFL, NOR, PEF, CIP 및 ENRO 등 fluoroquinolon계 항균제 5성분을 동시에 분석할 수 있는 최적 분석조건을 구명한 결과는 Table 2와 같다. 분석칼럼은 C₁₈의 Shiseido UG 120 column (250×4.6 mm i.d.)을 사용하였고, 이동상은 pH를 2.5로 조정한 0.1M phosphoric acid와 acetonitrile을 91 : 9의 비율로 혼합한 후 이동상 1000 mL 당 tetrahydrofuran(THF)를 5 mL 혼합한 것이 가장 좋았다. 검출기는 UV검출기보다 형광 검출기를 사용하여 Ex 280 nm, Em 450 nm에서 분석하는 것이 peak의 형태와 분리도가 우수하였다. 분석시간이 50분으로 길기 때문에 column 온도가 중요하였다. 칼럼의 온도가 변화함에 따라 retention time이 많이 흔들리는 경향을 가지고 있기 때문에 column온도를 일정하게 유지시키는 것이 중요하여 본 연구에서는 35℃로 고정하였다. 유속은 1 mL/min로 하였고, 시료는 20 μL를 주입하여 50분간 분석하였다.

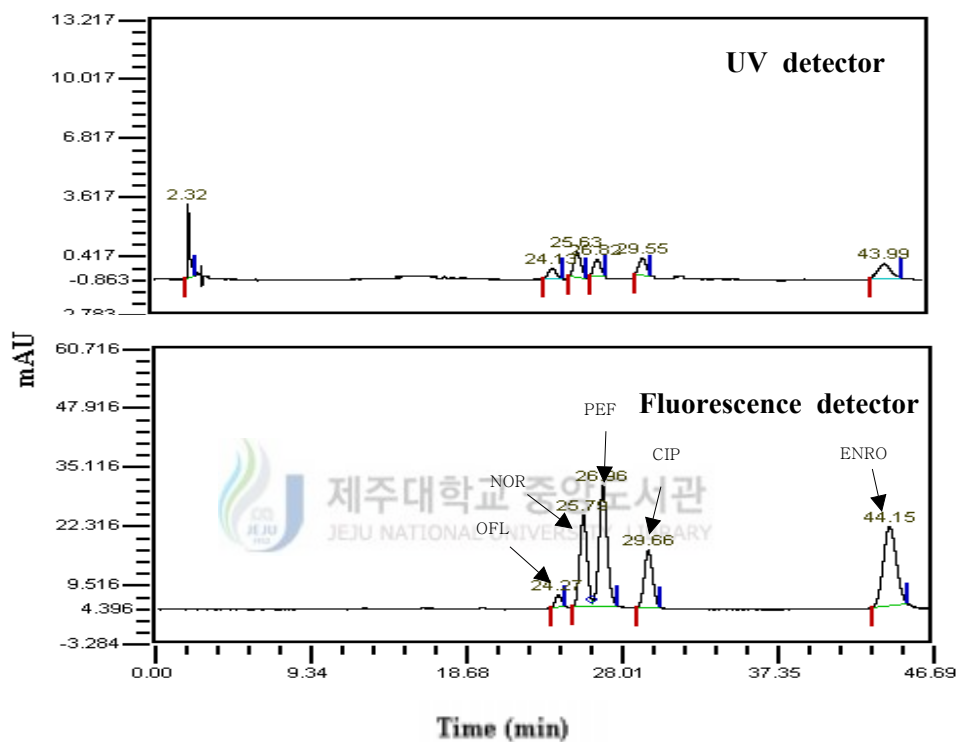


Fig. 8. Comparison of chromatograms of fluoroquinolones by UV and fluorescence detector. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

Table 2. The optimal conditions of HPLC analysis for determination of five fluoroquinolones in fishery products

Item	Analysis condition
HPLC system	Shiseido nanospace SI-2
Detector	Fluorescence Ex 280 nm Em 450 nm
Column temp	35 °C
Flow rate	1 mL/min
Column	Shiseido UG-120 type C ₁₈ , 4.6 mL ID x 250 mm
Injection volume	20 μL
Mobile phase	Acetonitrile : 0.1M Phosphoric acid (Added to tetrahydrofuran 5 mL, pH 2.5)



2) 어패류에서 추출한 플루오로퀴놀론계 항균제의 분석 결과

Nagao 등(1998)의 방법을 검토한 결과 채취한 시료의 양과 최종 HPLC 분석용 시료를 용해하는 방법에 문제가 제기되었다. 우선 채취하는 시료의 양이 0.5 g으로 수산물과 같이 부위별로 체성분이 다양한 시료에서는 시료 전체를 대표하기에는 너무 미흡하여 분석의 재현성이 떨어져 신뢰할 수 없는 값이 예상되었다. 또한 추출한 검체액을 이동상 5 mL로 정용하면 시료 중의 항균물질들을 희석하여 분석하는 것이 되어서 미량의 fluoroquinolone 계를 분석할 수가 없게 되는 등 어패류를 분석하기 위한 전처리 방법으로는 적당하지 않다고 판단되었다. 따라서 본 연구에서는 정확도를 높이고 미량의 항균제 분석법을 개발하고자 Nagao 등(1998)의 방법을 보완하였다. 전처리 과정 중에 방해물질을 제거하여 깨끗한 peak를 얻고 재현성을 높여 분석값의 신뢰도를 높이기 위하여 여러 가지 방법으로 전처리방법을 수정하였다. 우선 단백질을 제거하기 위하여 가열방식을 채택하는 등의 기존의 방법을 수정하여 Fig. 1과 같은 전처리 방법을 확립하여 좀 더 높은 회수율과 우수한 분리도를 얻을 수 있었다.

어패류에 fluoroquinolone계 표준용액을 첨가한 후 추출하여 분석한 chromatogram과 각 항균제의 retention time을 Fig. 9 및 Table 3에 나타내었다. Fluoroquinolone계 표준품 0.1 mg/kg를 첨가하여 분석한 chromatogram(A), 항균제가 함유되어 있지 않은 어류 시료의 chromatogram(B) 및 어류에 fluoroquinolone계 항균제 표준품을 0.1 mg/kg 첨가하여 어류 전처리 방법에 따라 추출한 후, 분석한 chromatogram(C)를 각각 비교하여 보면, 각 chromatogram에서와 같이 fluoroquinolone계 항균제의 각 성분별로 명료하게 분리되며 peak의 형태도 아주 양호한 chromatogram을 얻을 수 있었다. 또한 각 항균제의 retention time은 OFL 23.3 ± 0.15 min, NOR 24.9 ± 0.11 min, PEF 26.0 ± 0.09 min, CIP 28.6 ± 0.08 min 및 ENRO 42.3 ± 0.07 min 로 각 성분간에 간섭 없는 peak를 얻을 수 있었다. 따라서 본 방법으로 어패류 중의 fluoroquinolone계

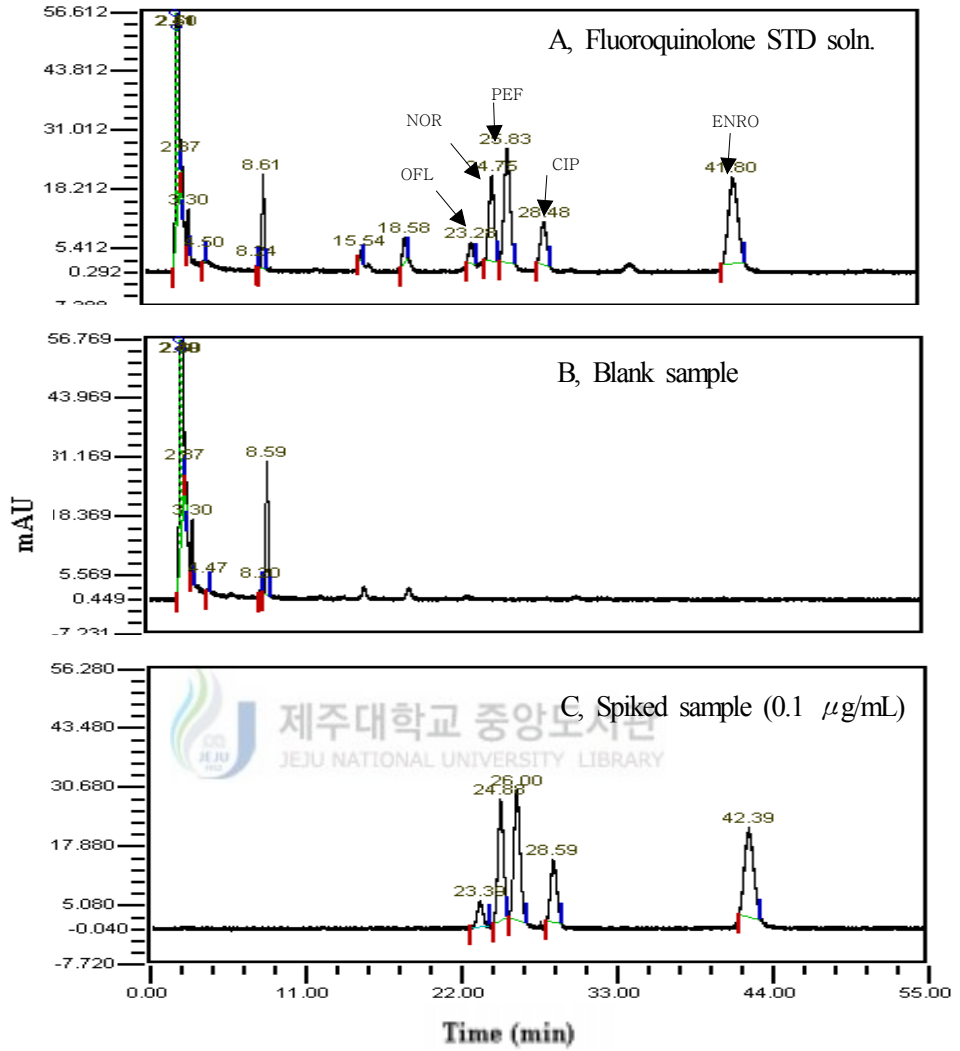


Fig. 9. Chromatograms of five fluoroquinolones in fish muscle. OFL, ofloxacin; NOR, norfloxacin; PEF, pefloxacin; CIP, ciprofloxacin; ENRO, enrofloxacin.

Table 3. Retention time of fluoroquinolones in fish muscle at HPLC analysis

Fluoroquinolones	Retention time (min)
Ofloxacin	23.3±0.15
Norfloxacin	24.9±0.11
Pefloxacin	26.0±0.09
Ciprofloxacin	28.6±0.08
Enrofloxacin	42.3±0.07



항균제를 분석하는 것은 정확도와 신뢰도가 높은 분석결과를 얻을 것으로 판단된다.

3) 표준용액 검량선의 작성

Fluoroquinolone계 항균제 5종의 혼합표준용액을 0.1-2.0 mg/kg의 농도범위에서 HPLC에 주입하여 형광검출기로 Ex 280nm, Em 450nm에서 농도에 대한 peak 면적비를 구하여 표준곡선을 작성한 결과 OFL에서는 $y=1364919x-36372$ ($R^2=0.9981$), NOR에서는 $y=3101316x-81327$ ($R^2=0.9995$), PEF에서는 $y=4593724x-47703$ ($R^2=0.9998$), CIP에서는 $y=3700914x-77163$ ($R^2=0.9994$) 그리고 ENRO에서는 $y=3853977x-181288$ ($R^2=0.9972$)로 모든 항균제에서 상관계수 0.99이상의 매우 양호한 직선상을 나타내었다(Fig. 10).

4) 검출한계 및 정량한계 측정

검출한계를 정하는 방법은 여러 가지 방법이 사용되고 있지만, 본 연구에서는 signal 대 noise의 비율에 기초한 방법을 사용하였다. signal 대 noise 비는 기지의 저농도 분석대상물질을 포함한 검체의 signal과 공시험 시료의 signal을 비교하여 구하고, 일반적으로 3~2:1의 signal 대 noise 비가 산출되는 분석대상 물질의 최저농도가 검출한계가 된다. 본 연구에서는 fluoroquinolone계 항균제 음성시료의 noise level에 대한 형광검출기 반응비로서 3:1의 비율을 기본으로 하여 설정하였다. 이러한 방법으로 측정된 fluoroquinolone계 항균제의 검출한계는 Table 4에 나타내었다. 검출한계를 측정하기 위하여 넙치, 뱀장어, 새우 및 굴에 fluoroquinolone계 항균제 혼합표준용액을 0.0005, 0.001, 0.002, 0.01, 0.1 mg/kg의 농도로 첨가하여 측정된 결과 OFL을 제외한 4성분은 0.001 mg/kg의 농도에서 peak가 정확히 분리된 반면, 0.0005 mg/kg에서는 baseline에서 peak를 구분하기 어려웠다. OFL은 0.005 mg/kg에서 확실한 peak를 보였다. 따라서 본 연구에서 구명한 추출방

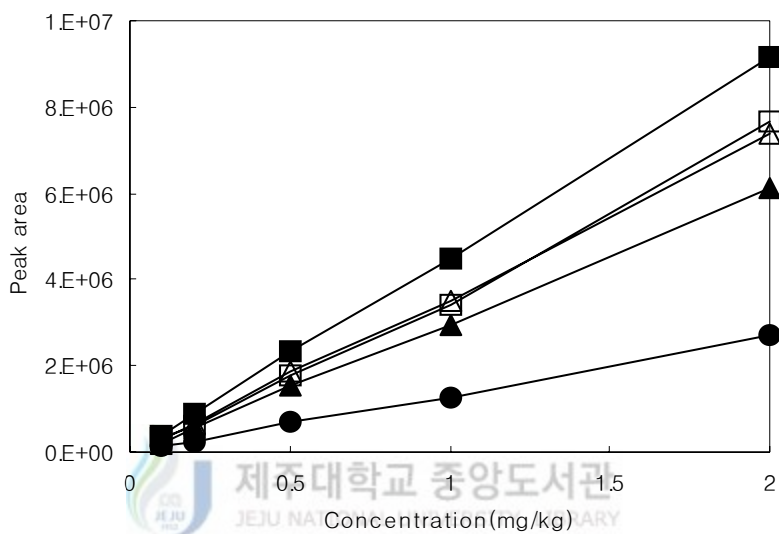


Fig. 10. Calibration curves of five fluoroquinolones standard solution. ●, ofloxacin; ■, pefloxacin; ▲, norfloxacin; △, ciprofloxacin; □, enrofloxacin.

Table 4. Limits of detection(LOD) of fluoroquinolones in some fisheries

Fluoroquinolones	LOD (mg/kg)			
	Olive flounder	Eel	Shrimp	Oyster
Ofloxacin	0.005	0.005	0.005	0.005
Norfloxacin	0.001	0.001	0.001	0.001
Pefloxacin	0.001	0.001	0.001	0.001
Ciprofloxain	0.001	0.001	0.001	0.001
Enrofloxacin	0.001	0.001	0.001	0.001

법 및 HPLC 분석조건에서의 검출한계는 OFL이 0.005 mg/kg, 그리고 나머지 성분들은 0.001 mg/kg로 판단되었다.

또한 시료별 각 fluoroquinolone계 항균물질의 정량한계는 Son (1999)의 이론에 따라 검출한계의 2배되는 측정값으로 설정하였다. 어종에 관계없이 OFL은 0.01 mg/kg, NOR, PEF, CIP 및 ENRO는 각각 0.002 mg/kg까지 정량이 가능하였다(Table 5).

최근 몇몇의 quinolones계 항균제에 대한 최대잔류한계(MRL)가 정해져 있는데, 소, 가금류, 돼지육에서의 MRL은 ENRO와 CIP의 합한 양으로 0.03 mg/kg으로 되어 있다(EU, 1998). Son (1999)이 보고한 3종의 fluoroquinolone계 항균제를 분석하기 위한 조건에서의 검출한계를 우유는 0.0025 mg/kg, 닭고기와 어류에서는 0.005 mg/kg로 구명한 바 있으며, Kim 등(2004)은 동물약품중에서 NOR, CIP 및 ENRO를 분석할 수 있는 방법을 개발하였는데, 자외선 검출기를 사용한 방법에서는 각 성분의 검출한계 및 정량한계를 0.6 mg/kg 및 2.0 mg/kg이라고 보고하였고, Samanidou 등(2003)은 혈청에서 NOR 및 CIP의 분석시 정량한계는 0.03 mg/kg, 검출한계는 0.01 mg/kg이라고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 이들의 수치보다 훨씬 낮은 정량한계 및 검출한계를 나타내고 있어 어패류에 미량 잔류하는 fluoroquinolone계 항균제를 분석하는데 매우 적합한 방법이라고 판단되었다.

5) 어류 및 패류에서의 회수율의 측정

어패류 중에서 fluoroquinolone계 항균제 5종의 회수율을 측정하기 위하여 fluoroquinolone계 항균물질이 잔류하지 않은 넙치, 뱀장어, 새우 및 굴 중의 어패류에 표준용액을 0.05-0.5 mg/kg이 되도록 각각 첨가한 다음 시료에 대한 전처리한 후, 추출·정제하고 HPLC로 분석하였다. 각 시료에 대한 회수율은 3회 반복 시험하였다.

Table 5. Limits of quantitation(LOQ) of fluoroquinolones in some fisheries

Fluoroquinolones	LOQ (mg/kg)			
	Olive flounder	Eel	Shrimp	Oyster
Ofloxacin	0.01	0.01	0.01	0.01
Norfloxacin	0.002	0.002	0.002	0.002
Pefloxacin	0.002	0.002	0.002	0.002
Ciprofloxain	0.002	0.002	0.002	0.002
Enrofloxacin	0.002	0.002	0.002	0.002

Table 6에 넙치 근육중에서 추출한 회수율을 나타내었다. OFL 회수율은 72.3~84.5% ($\pm 2.5\sim 1.2$), 변이계수 CV값은 3.60~1.45%를 나타내었으며, NOR은 102.7~109.3% ($\pm 9.0\sim 7.5$), CV는 1.21~8.76%, PEF는 105.3~107.9% ($\pm 6.8\sim 8.6$), CV 6.45~7.97%, CIP는 99.3~103.5% ($\pm 21\sim 12.4$), CV는 1.97~12.45% 그리고 ENRO는 94.7~100.0% ($\pm 0.5\sim 9.8$), CV는 0.48~9.76%를 나타내었다. OFL이 회수율이 가장 낮았으며, 그 외 항균제는 100% 전후의 아주 양호한 회수율을 나타내었다. Table 7은 뱀장어 근육중에서 추출한 회수율을 나타내었다. OFL는 70.0~90.0% ($\pm 0.0\sim 7.6$), CV는 0.00~9.40%, NOR은 95.3~107.7% ($\pm 0.5\sim 9.6\%$), CV는 1.49~9.83%, PEF는 98.7~106.7% ($\pm 0.9\sim 9.0$), CV는 0.96~8.43%, CIP는 95.0~102.5% ($\pm 1.8\sim 8.2$), CV는 1.75~8.50% 그리고 ENRO는 95.3~100.0% ($\pm 0.9\sim 6.8$), CV는 1.01~7.10%를 나타내었다. Table 8에는 새우에 대한 회수율을 나타내었다. OFL는 72.7~82.5% ($\pm 1.2\sim 8.4$), CV는 1.72~10.39%, NOR은 86.3~96.0% ($\pm 1.6\sim 3.8\%$), CV는 1.70~4.37%, PEF는 86.0~93.3% ($\pm 0.9\sim 3.6$), CV는 1.01~4.14%, CIP는 80.7~89.1% ($\pm 0.9\sim 5.0$), CV는 1.10~4.21% 그리고 ENRO는 82.0~84.7% ($\pm 1.9\sim 5.0$), CV는 2.19~2.23%를 나타내었다. Table 9는 굴에 대한 회수율을 나타내었다. OFL는 78.0~83.4% ($\pm 1.0\sim 9.0$), CV는 1.22~11.06%, NOR은 82.7~92.7% ($\pm 2.5\sim 4.8\%$), CV는 2.69~5.62%, PEF는 85.3~86.7% ($\pm 2.1\sim 6.6$), CV는 2.50~7.73%, CIP는 76.0~90.7% ($\pm 1.1\sim 7.7$), CV는 1.20~9.85% 그리고 ENRO는 78.7~90.5% ($\pm 1.2\sim 7.4$), CV는 1.31~9.36%를 나타내었다. 넙치에서의 회수율이 가장 높았으며, 다음이 뱀장어, 새우, 굴의 순이었고, 항균제별로는 OFL이 모든 어종에서 가장 낮았으며, 혼합 표준용액의 첨가농도별에서는 0.5 mg/kg이 가장 높은 회수율을 나타내었다. Nagao 등(1998)은 0.5 mg/kg에서 OFL이 86.0 \pm 4.5%, 0.25 mg/kg에서 ENRO는 86.3 \pm 4.4%를 나타내었다고 하였는데, 본 실험의 결과는 Nagao 등(1998)의 보고에서 보다 훨씬 높은 회수율을 나타내었다. 한편, Gigosos 등(2000)은 닭고기 근육에서 fluoroquinolone계 항균제의 회수율은 100 ng/g을 첨가한 닭고기에서 UV검출기와 하였을때

Table 6. Average recovery* of fluoroquinolones in olive flounder muscle (%)

Fluoroquinolones	Fortification level (mg/kg)		
	0.05 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
Ofloxacin	72.3±2.5	83.3±2.1	84.5±1.2
CV**	3.60	2.47	1.45
Norfloxacin	102.7±9.0	103.3±1.2	109.3±7.5
CV	8.76	1.21	6.86
Pefloxacin	105.3±6.8	116.0±7.9	107.9±8.6
CV	6.45	6.79	7.97
Ciprofloxain	99.3±12.4	104.3±2.1	103.5±8.2
CV	12.45	1.97	7.91
Enrofloxacin	94.7±9.3	97.3±0.5	100.0±9.8
CV	9.81	0.48	9.76

* Average recovery was obtained from 3 replications.

** Coefficient of variation

Table 7. Average recovery* of fluoroquinolones in eel muscle(%)

Fluoroquinolones	Fortification level (mg/kg)		
	0.05 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
Ofloxacin	70.0±0.0	80.7±7.6	90.0±5.0
CV**	0.00	9.40	5.52
Norfloxacin	97.3±9.6	95.3±0.5	107.7±2.6
CV	9.83	0.49	2.41
Pefloxacin	106.7±9.0	98.7±0.9	105.9±2.6
CV	8.43	0.96	2.42
Ciprofloxain	96.7±8.2	95.0±3.6	102.5±1.8
CV	8.50	3.75	1.75
Enrofloxacin	100.0±5.9	93.3±0.9	95.3±6.8
CV	5.89	1.01	7.10

* Average recovery was obtained from 3 replications.

** Coefficient of variation

Table 8. Average recovery* of fluoroquinolones in shrimp muscle (%)

Fluoroquinolones	Fortification level (mg/kg)		
	0.05 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
Ofloxacin	80.7±8.4	72.7±1.2	82.5±7.0
CV**	10.39	1.72	8.46
Norfloxacin	96.0±1.6	86.3±3.8	89.9±2.8
CV	1.70	4.37	3.13
Pefloxacin	93.3±0.9	86.0±3.6	90.0±1.4
CV	1.01	4.14	1.55
Ciprofloxacin	85.3±0.9	80.7±3.4	89.0±1.2
CV	1.10	4.21	1.39
Enrofloxacin	84.7±1.9	82.0±5.0	86.3±1.9
CV	2.23	6.06	2.19

* Average recovery was obtained from 3 replications.

** Coefficient of variation

Table 9. Average recovery* of fluoroquinolones in oyster (%)

Fluoroquinolones	Fortification level (mg/kg)		
	0.05 mg/kg	0.1 mg/kg	0.5 mg/kg
Ofloxacin	81.3±9.0	78.0±7.8	83.4±1.0
CV**	11.06	9.99	1.22
Norfloxacin	92.7±2.5	82.7±3.3	85.3±4.8
CV	2.69	3.99	5.62
Pefloxacin	85.3±6.6	86.7±6.3	85.4±2.1
CV	7.73	7.32	2.50
Ciprofloxacin	76.0±4.3	78.3±7.7	90.7±1.1
CV	5.68	9.85	1.20
Enrofloxacin	78.7±7.4	78.7±5.9	90.5±1.2
CV	9.36	7.51	1.31

* Average recovery was obtained from 3 replications.

** Coefficient of variation

72~98%의 회수율을 얻었다고 보고하였다. Codex에서 정한 규격에 의하면 잔류허용기준의 0, 0.5×, 1× 및 2×의 농도로 시료에 표준물질을 첨가하여 시험하였을 때 시료간의 분석오차의 척도인 변이계수 CV(coefficient of variation)의 허용범위는 농도 ≤ 0.001 mg/kg인 경우 35%, 0.001 mg/kg<농도 ≤ 0.01 mg/kg인 경우 30%, 0.01 mg/kg<농도 ≤ 0.1 mg/kg인 경우 20%, 0.1 mg/kg<농도인 경우 15%이며, 회수율 허용범위는 농도 ≤ 0.001 mg/kg인 경우 50~120%, 0.001 mg/kg<농도 ≤ 0.01 mg/kg 인 경우 60~120%, 0.01 mg/kg<농도 ≤ 0.1 mg/kg인 경우 70~110%, 0.1 mg/kg<농도인 경우 80~110%로 권고되어 있다(Choi 등, 2005). 본 연구에서 얻어진 모든 시료중에서의 CV값은 10%이하였고, 회수율은 80%이상의 값을 나타내어 Codex의 규정에 부합되는 실험결과를 얻었다.

6) 플루오로퀴놀론계 항균제의 안정성 시험

기기분석시 표준품의 희석용액을 사용할 때엔 얼마동안 저장하면서 사용이 가능한지에 대한 validation은 매우 중요한 문제이다. 따라서 본 연구에서는 fluoroquinolone계 항균제의 표준품에 대한 표준용액 및 전처리 후 추출시료에 대한 저장 안정성에 대하여 경시적으로 조사하였다.

Fluoroquinolone계 표준품을 100 mg/kg의 stock solution을 만들고 상온(25°C)과 냉장(4°C)에 보관하여 분석하는 당일 각각을 꺼내어 working solution을 0.5 mg/kg, 1.0 mg/kg으로 만들어 일주일 간격으로 peak 면적값의 경향을 비교하였다. Fig. 11에서는 100 mg/kg stock solution을 상온 및 냉장 보관하여 0.5 mg/kg과 1.0 mg/kg으로 희석하여 HPLC에 주입하고 날짜별로 분석 비교한 결과를 나타내었다. Stock solution의 경우는 상온, 냉장보관 하였을 때 area%로 비교한 결과 5주째까지 약 90.7%정도로 약 10% 감소한 것으로 나타났다. 따라서 100 mg/kg stock solution을 만들었을 경우 약 5주째까지는 상온이나 냉장보관하여도 안정하였다.

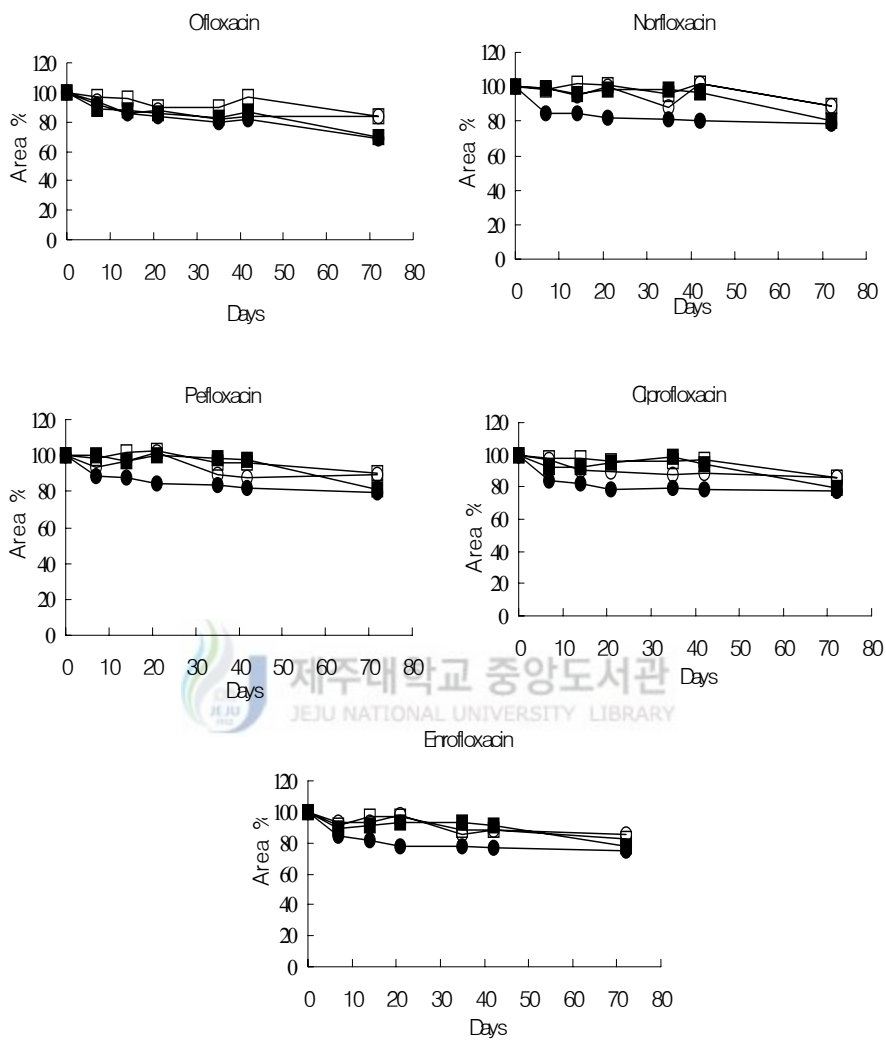


Fig. 11. Stability of stock solution during storage according to the concentration and storage temperature. ■, Refrigeration, 0.5 mg/kg; □ Refrigeration, 1.0 mg/kg; ●, Room temperature, 0.5 mg/kg; ○ Room temperature, 1.0 mg/kg.

Working solution을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 mg/kg으로 만들고 상온(25℃)과 냉장(4℃) 보관하면서 날짜에 따라 peak 면적값을 비교하여 Fig. 12에 나타내었다. Working solution을 상온과 냉장보관 하였을 때 상온의 경우 검량선의 기울기는 저장일수가 경과할수록 급격히 감소하는 것을 알 수 있었으며, 냉장보관의 경우는 23일까지는 안정하다가 그 이후로 급격히 감소하였다. 최초 실험시 peak 면적을 100%로 하였을 때 상온보관의 경우는 2일까지는 약 95.5%로 안정하였으며, 제조 후 약 3일까지는 안정하였다. 또한 working solution의 농도가 낮을수록 시간에 대하여 표준용액이 불안정한 것으로 나타났다. 냉장 보관하였을 때의 경우는 0.1 mg/kg을 제외하고는 15일째까지는 아주 안정한 것으로 보였으며, 23일에는 78.7% (0.2 mg/kg)로 최대 감소 농도 폭이 약 23%정도였다.

어류 시료에 0.1 mg/kg과 0.5 mg/kg fluoroquinolone계 항균제 혼합 표준용액을 첨가하여 시료처리방법에 따라 전처리한 후 저장안정성을 시험한 결과를 Fig. 13에 나타내었다. Spiked sample에 대한 표준품의 저장안정성을 area %로 비교하여 보면, 시료에 첨가하여 전처리 과정을 거친 표준품은 working solution에 비하여 상당히 안정한 것으로 나타났다. 상온보관의 경우는 30일째까지는 약 90%로 안정하였고 37일째는 86.3%로 약 14%정도 감소하는 경향을 보였으며, 냉장 보관하였을 경우는 37일까지 초기 피크면적에 비하여 90%로 약 10%정도 감소된 것으로 나타나 상당히 안정한 편이었다. 대부분의 실험자들은 표준용액을 제조한 후 냉장고에 보관하면서 2-3개월간은 안정하였다고 보고하고 있다(Gigosos 등, 2000; York와 Froc, 2000).

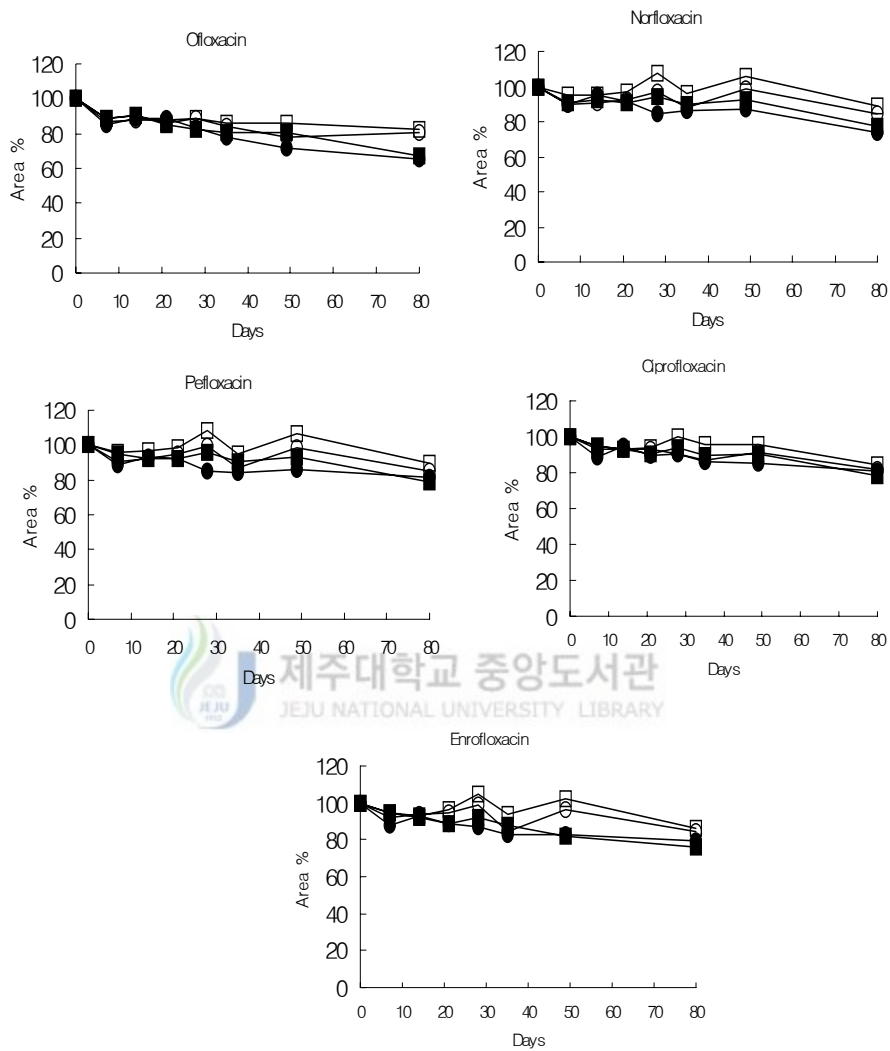


Fig. 12. Stability of working solution during storage according to the concentration and storage temperature. ■, Refrigeration, 0.5 mg/kg; □ Refrigeration, 1.0 mg/kg; ●, Room temperature, 0.5 mg/kg; ○ Room temperature, 1.0 mg/kg.

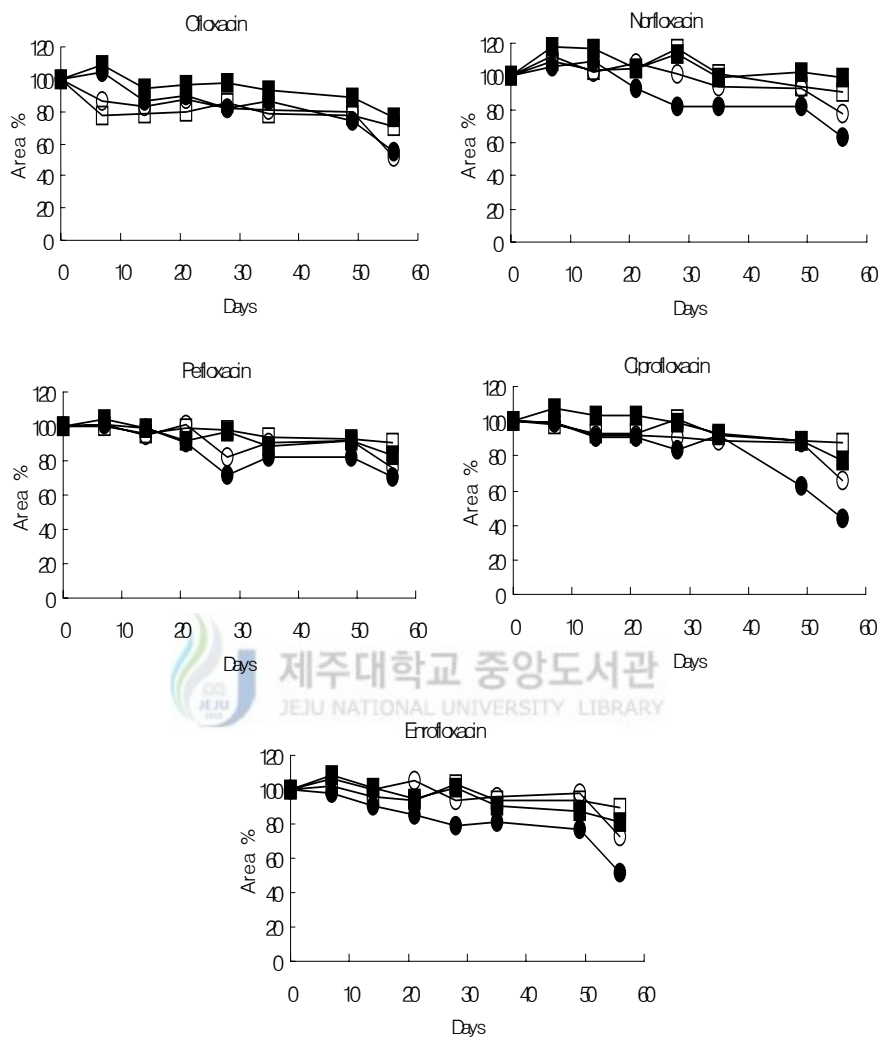


Fig. 13. Stability of spiked sample during storage according to the concentration and storage temperature. ■, Refrigeration, 0.5 mg/kg; □ Refrigeration, 1.0 mg/kg; ●, Room temperature, 0.5 mg/kg; ○ Room temperature, 1.0 mg/kg.

2. 남해안 양식 어패류에 대한 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태 조사

1) 양식어패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태 조사

2004년 5월부터 2005년 9월까지 우리나라 남해안에서 양식산업이 발달되어 있는 부산, 거제, 통영, 여수, 완도 및 제주지역 등 6개 지역에 위치한 10개 양식장과 이 지역에서 양식되어 출하되고 있는 어류를 대상으로 fluoroquinolone계 항균제인 오플록사신(OFL), 노르플록사신(NOR), 페플록사신(PEF), 시프로플록사신(CIP) 및 엔로플록사신(ENRO) 등 5성분에 대한 잔류량 모니터링을 실시한 결과는 다음과 같다. 또한 육상 및 어류양식장에서 사용하는 항균제가 양식패류에 영향을 미치는 지를 파악하기 위하여 남해안 연안해역에 위치한 양식패류를 대상으로 fluoroquinolone계 항균제 오염실태를 조사하였다.

(1) 양식어류 중의 어종별 플루오로퀴놀론계 항균제 잔류실태

남해안 연안에 위치한 육상 및 해상어류양식장에서 채취한 넙치, 조피볼락, 참돔 및 농어 등 4종 양식어류에 대한 fluoroquinolone계 항균제의 잔류실태를 Table 10에 나타내었다.

넙치는 주로 육상에서 수조식으로 양식되고 있는 우리나라 대표적인 양식품종으로 부산, 거제, 완도 및 제주지역에서 가장 활발하게 양식되고 있는 품종으로 본 조사에서도 이들 4개 지역 5개 양식장을 조사대상으로 선정하였다. 시험에 사용한 넙치는 체중 102.0~1394.5 g(평균 473.3±305.6 g), 체장 20.0~46.0 cm(평균 32.0±6.7 cm)로 총 135마리를 분석하였다. fluoroquinolone계 항균제는 연쇄상구균증, 비브리오병, 에드워드병 등을 치료하기 위하여 넙치양식장에서 주로 사용하고 있으며, 조사기간 중 양식 넙치에서는 fluoroquinolone계 항균제 5성분 모두 검출되었으나, CIP 및 ENRO가 대부분이었다. CIP의 검출범위는 불검출~0.859 mg/kg이었으며, ENRO의 검출범위는 불검출~0.348 mg/kg의 잔류량을 나타내었다.

Table 10. Ranges of residual fluoroquinolones in the muscle of the different farmed fish species

Fishes	Sample		Fluoroquinolones (mg/kg)						Number of samples
	weight (g) (Average±SD)	Length(cm) (average±SD)	OFL	NOR	PEF	CIP	ENRO		
Olive flounder	102.0~1394.5	20.0~46.0	ND*~0.063	ND~0.006	ND~0.007	ND~0.859	ND~0.348	135	
	(473.3±305.6)	(32.0±6.7)	(3)**	(3)	(2)	(44)	(43)		
Black rock fish	104.7~707.9	17.0~35.0	ND	ND	ND~0.004	ND~0.013	ND~0.008	72	
	(344.1±130.8)	(26.7±3.9)	(0)	(0)	(1)	(2)	(2)		
Sea bass	66.6~444.6	19.0~34.0	ND	ND	ND~0.004	ND~0.008	ND~0.143	54	
	(232.8±103.6)	(26.7±3.6)	(0)	(0)	(2)	(3)	(21)		
Red sea bream	598.2~1265.0	31.5~39.0	ND ¹⁾	ND~0.006	ND	ND	ND~0.006	18	
	(857.3±196.3)	(34.7±2.5)	(0)	(1) ²⁾	(0)	(0)	(2)		

* Not Detected;

** No. of detected samples

농어는 해상가두리양식장에서 주로 양식되고 있으며 본 조사에서는 통영 및 여수에 위치한 해상가두리 양식장을 대상으로 잔류실태를 조사하였다. 시험에 사용한 농어는 체중 66.6~444.6 g(평균 232.8±103.6 g), 체장 19.0~34.0 cm(평균 26.7±3.6 cm)의 양성중인 것을 주로 사용하였으며, 총 54마리의 시료를 분석에 사용하였다. 농어에서의 fluoroquinolone계 항균제 중 PEF는 불검출~0.004 mg/kg의 잔류량을 나타내었고, CIP는 불검출~0.008 mg/kg, ENRO는 불검출~0.143 mg/kg의 잔류량을 나타내었으나, OFL 및 NOR는 전혀 검출되지 않았다.

조피볼락은 우리나라 양식어류 중에서 두 번째로 많이 생산되고 있는 양식품종이다. 조피볼락에 대한 잔류량 조사는 통영, 여수 및 완도지역에 위치한 해상가두리 양식장 3개소에서 실시하였다. 시험에 사용한 조피볼락은 체중 104.7~707.9 g(평균 344.1±130.8 g), 체장 17.0~35.0 cm(평균 26.7±3.9 cm)의 것을 사용하였으며, 총 72마리의 시료를 분석에 사용하였다. 조피볼락에서의 fluoroquinolone계 항균제 중 PEF는 불검출~0.004 mg/kg, CIP는 불검출~0.013 mg/kg, 및 ENRO는 불검출~0.008 mg/kg으로 상당히 낮은 잔류농도를 나타내었고, OFL 및 NOR는 전혀 검출되지 않았다. 따라서 조피볼락은 넙치나 농어에 비하여 상당히 낮은 잔류량을 나타내고 있어 양식중 fluoroquinolone계 항균제를 거의 사용하지 않고 있는 것으로 파악되었다.

참돔에 대해서는 통영의 해상가두리 양식장 1개소에서 항균제 잔류량 모니터링을 실시하였다. 시험에 사용한 참돔은 체중 598.2~1265.0 g(평균 857.3±196.3 g), 체장 31.5~39.0 cm(평균 34.7±2.5 cm)의 것을 사용하였으며, 총 18마리의 시료를 분석에 사용하였다. 참돔에서는 OFL, PEF 및 CIP가 전혀 검출되지 않았지만, NOR가 1개 시료에서 0.006 mg/kg의 농도로 검출되었고, ENRO이 2개 시료에서 0.006 mg/kg의 농도로 검출되어 다른 어종에 비하여 fluoroquinolone계 항균제의 잔류량이 상당히 낮았다. 시료로 제공된

참돔은 출하를 앞둔 성어로 탐문조사한 결과 항균제는 전혀 사용하고 있지 않는 것으로 파악되었으나, 조사결과 일부 시료에서 낮은 농도지만 fluoroquinolone계 항균제가 검출되고 있어 양성중에 사용한 항균제가 완전히 배출되지 않고 잔류하고 있는 것으로 추정되었다.

한편, fluoroquinolone계 항균제에 대한 어종별 검출율을 구분하여 Fig. 14에 나타내었다. 조사 대상 어종 중 양식 넙치가 70.4%에서 검출되어 가장 높은 검출율을 나타내었으며, 성분별로는 CIP가 32.6%로 가장 높았고, 다음이 ENRO로 31.9%의 시료에서 검출되었으며, OFL, NOR 및 PEF는 5.9%의 시료에서만 검출되어 아주 낮은 검출율을 보였다. 조피볼락 및 농어는 각각 7.0 및 48.2%의 검출율을 보였으며, 성분별로는 PEF, CIP 및 ENRO만 검출되었는데, 특히 농어는 ENRO의 검출율이 높았다. 참돔의 검출율은 16.7%였으며, NOR 및 ENRO만이 검출되었다.

이상의 결과로부터 fluoroquinolone계 항균제는 거의 모든 양식장에서 양식어종에 관계없이 사용하고 있으며, 특히 넙치 양식장에서 많이 사용하는 것으로 확인되었다. CIP 및 ENRO를 제외하고 사용하는 항균제에 비하여 검출율이 낮은 이유는 fluoroquinolone계 항균제의 휴약기간이 짧아 체내에 머무는 시간이 짧기 때문에 사용하는 양에 비하여 검출율이 낮은 것으로 사료된다. 또한 fluoroquinolone계 항균제가 수산용 항균제로 가장 많이 사용되는 OTC에 비하여 경제적으로 고가이기 때문에 양식장의 규모에 따라 사용하는 항균제가 달라질 수 있을 것으로 추정되었다.

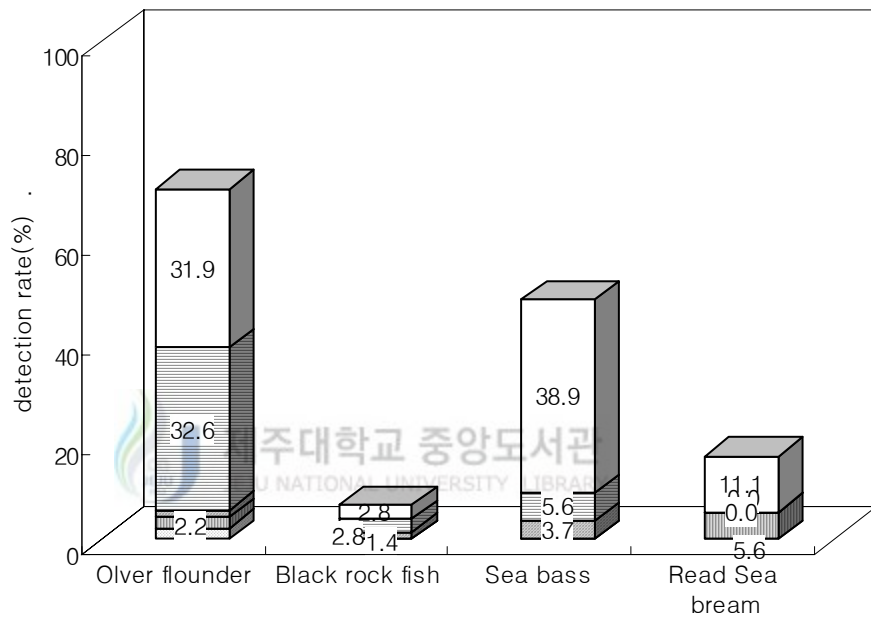


Fig. 14. Detection rates of fluoroquinolones in the muscle of the different farmed fish species. ▤, ofloxacin; ▨, norfloxacin; ▩, pefloxacin; ▧, ciprofloxacin; □, enrofloxacin.

(2) 양식어류에 대한 시기별 플루오로퀴놀론계 항균제 검출을 비교

우리나라의 어류 양식업에서 질병발생 현황을 살펴보면, 1980년대에는 어류질병 발생시기가 고수온기에 제한되어 집중적으로 발생하였고, 또한 발생하는 질병의 종류도 세균성 및 기생충성 질병의 단독감염이 주를 이루고 있다. 그리고, 1990년대의 전반에 발병률이 5% 미만에 불과하던 것이 1990년대 후반부터는 15% 내외로까지 증가하였다. 질병의 발생시기도 고수온기에만 주로 발생하던 성향이 연중 발생하는 추세로 되었고, 또 발생 질병의 종류도 전염성 바이러스질병 및 세균·세균, 세균·기생충, 세균·바이러스 및 3종 이상 병원체 혼합되는 혼합감염형이 증가하는 경향이였다. 그리고, 최근에는 이리도바이러스병과 같은 난치성 악성 전염병의 발생 증가로 양식어류의 피해가 증대되고 있다(Heo 등, 2002; 전, 2000).

Fig. 15에는 2004년 5월부터 2005년 9월까지 육상 및 해상 상어류양식장에서 양식중인 양식어류에 대한 fluoroquinolone계 항균제의 시기별 검출율을 나타내었다. 시기에 따라 다르지만 우리나라 어류양식장에서는 OFL, NOR, PEF, CIP 및 ENRO 등 fluoroquinolone계 항균제를 모두 사용하고 있는 것으로 확인되었다. 이중 CIP 및 ENRO는 조사기간 중 거의 매월 검출되었으며, 7월과 8월에 일부 시료에서 NOR 및 PEF이 검출된 바 있으며, 2005년 4월에는 2004년에 전혀 검출이 되지 않았던 OFL이 검출되었다.

Fluoroquinolone계 항균제의 검출율은 2004년 4월에 40%였던 것이 하절기로 갈수록 높아져 8월에는 60%이상의 시료에서 fluoroquinolone계 항균제가 검출되었으며, 9월 및 10월에는 검출율이 감소하는 경향을 보였다. 2005년도에는 5월과 9월조사에서 60%정도의 검출율을 나타내어 매년 비슷한 수준의 항균제를 사용하고 있는 것으로 파악되었다. CIP의 경우 5월에 18%의 검출율을 보이던 것이 7월에는 54%의 시료에서 검출되었다. 그러나 8월에는 OFL을 제외한 NOR, PEF, CIP 및 ENRO이 모두 검출되었다. 항균제별

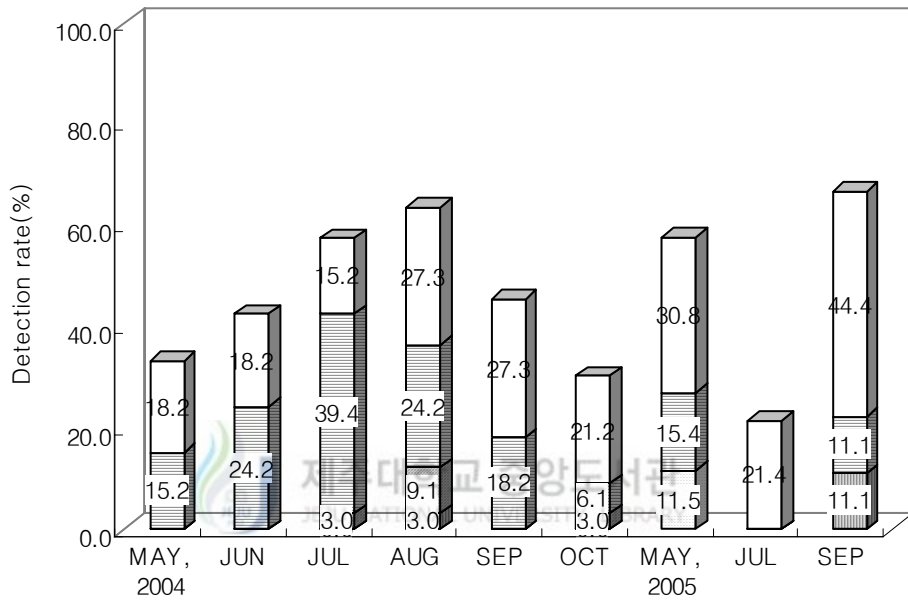


Fig. 15. Monthly detection rate of fluoroquinolones in the muscle of farmed fish. ▨, ofloxacin; ▤, norfloxacin; ▧, pefloxacin; ▥, ciprofloxacin; □, enrofloxacin.

잔류농도를 살펴보면 2004년 9월에 채취한 시료중에 CIP이 0.859 mg/kg의 아주 높은 농도를 보인 것도 있으며, ENRO은 2004년 8월과 9월에 각각 0.1mg/kg을 초과하여 검출되었다. 검출 시료수에 있어서도 하절기인 6-9월에 집중적으로 검출되고 있는 것으로 보아 하절기에 많이 사용하고 있는 것으로 판단 되었다. 식품위생법에는 “항생물질 등 동물용의약품 잔류허용기준을 정할 때 안전성 및 유효성에 문제가 있는 것으로 확인되어 제조 또는 수입품목허가를 하지 아니하는 동물용의약품은 검출되어서는 아니 된다(식품의약품안전청 고시 제2004-18호)”고 규정되어 있다. 어류에 대한 fluoroquinolone계 항균제는 아직까지 우리나라에서 잔류기준이 정하여져 있지 않으며, 일본에서도 잔류 허용 기준치가 정하여져 있지 않기 때문에 검출이 되어서는 안되는 항균제로 규정되어 있다. 그러나 EU에서는 CIP과 ENRO이 단독 또는 합한양으로 0.1mg/kg이하여야 한다고 규정되어 있어 우리나라에서 기준치의 신설이 국민건강 보호 및 국제 교역 등을 위하여 시급한 것으로 생각된다.

어류에서는 수온에 따라 약제 잔류기간은 차이가 있으며 일반적으로 수온이 높을 수록 신속히 대사 되는 것으로 알려지고 있다. 우리나라 연안의 경우 수온은 연중 눈에 띄만한 변화가 있으므로 여름철에 약제를 투약한 경우는 겨울철 보다 짧은 기간 내에 배출될 것으로 사료된다. 국립수산과학원(2002)에서 발행한 「수산용 약품사용 안내」에는 어종별로 약제별 휴약기간이 권고되고 있으며, 식품위생 안전 확보를 위해서는 각각의 어종에 대하여 계절별로 약물잔류를 면밀히 분석하여서 보다 정확한 휴약기간을 설정되어야 할 것으로 생각되었다.

잔류실태 조사 중 우리나라의 대부분 어류양식장에서는 양식과정에서 질병치료를 위하여 항균제를 투약하고 있었으며, 또 성장발육을 촉진하기 위하여 비타민제 등 영양제를 양어용 사료와 함께 혼합하여 투여하는 경우

가 많았다. 대부분의 양식장에서는 어류의 질병 치료용으로 사용한 항균제 관리일지에 사용이력을 기록하고 있었다. 또한 항균제 잔류량 분석을 위한 시료 채취 시 탐문조사에서 항균제를 사용한다고 밝힌 경우나, 밝히지 않은 경우 모두 출하 시에는 식품위생법에서 정하는 기준치 이하의 잔류농도를 유지한 것으로 확인할 수 있었다.

(3) 지역별 양식어류에 대한 항균제 잔류량 모니터링

어류 양식 지역에 대한 항균제의 사용 실태를 알아보기 위하여 양식어류 중의 항균제 잔류 모니터링을 어류양식이 성행하고 있는 남해안의 부산, 통영, 거제, 여수, 완도, 제주지역의 어류 양식장을 대상으로 조사한 결과를 Table 11에 나타내었다. 부산지역에서는 1개소의 넙치 육상어류양식장에서 조사하였는데, 시험어로 사용한 넙치는 체중이 727.3 ± 255.2 g, 전장은 38.2 ± 4.0 cm이었으며, 조사 시 양식장의 수온은 $16.5\text{-}25.4^\circ\text{C}$ 로 동해안 표층수를 유입하여 양식용수로 사용하고 있었다. 조사결과 fluoroquinolone계 항균제에 속하는 CIP는 전체 시료 중 55%의 높은 검출율을 나타내었으며, 최대 검출농도도 0.430 mg/kg으로 매우 높은 값이었다. 이는 여름철 태풍으로 인하여 양식어류에 애드워드병이 발병하여 이를 치료하기 위하여 8월 20일부터 10일간 CIP를 투약한 이력이 있었다. 이때 어체 중 당 100 mg/kg이 되도록 투약하였고, 9월에 조사하였기 때문에 검출농도가 $0.006\text{-}0.430$ mg/kg으로 가장 높은 잔류농도를 나타내고 있었다. 그러나 조사결과 낮은 농도지만 계속 검출되고 있는 것으로 보아 5월부터 사용한 것으로 추정되었다. 8월에 사용한 CIP이 10월에 조사한 시료에서도 일부 검출되고 있는 것으로 보아 fluoroquinolone계 항균제는 체내에 투여되었을 때 장기간 잔류하는 것으로 추정되었다.

Table 11. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the muscle of the farmed fish from 2004 to 2005

Region	Species	Sample			Fluoroquinolone Antibiotics (mg/kg)						No. of sples
		Weight(g)	Length(cm)	OFL	NOR	PEF	CIP	ENRO			
Busan	olive flounder	727.3±255.2	38.2±4.0	ND*	ND	ND	ND-0.430 (15)	ND-0.017 (1)	27		
	red sea bream	857.3±196.3	34.7±2.5	ND	ND-0.006 (2)	ND-0.002 (1)	ND	ND-0.006 (2)	18		
Tongyeong	black rock fish	374.5±87.7	27.0±2.1	ND	ND-0.002 (2)	ND	ND	ND	27		
Geoje	olive flounder	465.1±275.8	32.6±5.8	ND-0.063 (3)**	ND	ND-0.007 (1)	ND-0.012 (5)	ND-0.340 (21)	27		
	sea bass	302.8±76.2	28.9±2.8	ND	ND	ND-0.004 (2)	ND-0.007 (2)	ND-0.143 (22)	27		
Yeosu	black rock fish	341.2±140.4	27.2±4.0	ND	ND	ND-0.004 (1)	ND-0.013 (2)	ND-0.008 (2)	27		
	sea bass	162.8±76.7	24.6±3.0	ND	ND	ND-0.002 (1)	ND-0.008 (1)	ND	27		
Wando	black rock fish	304.2±156.1	25.4±5.2	ND	ND	ND	ND	ND	18		
	olive flounder	557.6±360.5	32.9±6.9	ND	ND	ND-0.005 (2)	ND-0.018 (10)	ND-0.052 (7)	27		
Jeju	olive flounder	308.2±186.7	28.1±5.3	ND	ND-0.006 (3)	ND	ND-0.072 (15)	ND-0.162 (15)	54		

* Not Detected;

** No. of detected samples

통영지역에서는 해상어류양식장 1곳에서 참돔 및 조피볼락에 대한 모니터링을 실시하였다. 시험에 사용한 양식 참돔의 경우 체중은 857.3 ± 196.3 g, 체장은 34.7 ± 2.5 cm이었으며, 조피볼락은 체중이 374.5 ± 87.7 g, 체장은 27.0 ± 2.1 cm이었다. 통영지역에서는 소규모의 해상어류양식장을 대상으로 하였기 때문에 fluoroquinolone계 항균제의 검출률은 아주 낮았으나, NOR, PEF 및 ENRO이 검출되었고, 최대 잔류량은 0.006 mg/kg으로 매우 극미량이었다.

거제지역에서는 육상어류양식장과 해상어류양식장에서 각각 넙치와 농어를 대상으로 잔류모니터링을 실시하였다. 넙치는 체중이 465.1 ± 275.8 g, 체장은 32.6 ± 5.8 cm이었고, 농어는 체중이 302.8 ± 76.2 g, 체장은 28.9 ± 2.8 cm이었다. 시험어는 동일 수조에서 양식되고 있는 것을 지속적으로 채취하였으며, 조사가 끝날 때까지 출하되지 않았다. 조사 시의 농어 양식을 하고 있는 해상가두리 양식장의 수온은 16.5 - 24.5 °C이고, 넙치양식을 하고 있는 육상양식장은 16.5 - 25.0 °C의 범위였다. 해상가두리와 아주 가까운 곳에서 해수를 취수하여 육상양식을 하고 있었으므로 육상과 해상의 수온 차이는 거의 없었다. 거제지역에서 조사한 항균제 잔류량 모니터링 결과 넙치에서는 NOR을 제외한 OFL, PEF, CIP 및 ENRO 모두 검출되었으며, 각 항균제의 최대 농도는 0.063 , 0.007 , 0.012 및 0.340 mg/kg이었지만, ENRO를 제외하고는 잔류량이나 검출율이 낮았다. ENRO는 전체시료중 77.8%에서 검출되어 본 양식장에서는 ENRO를 상당히 많이 사용하는 것으로 확인되었다. 한편, 같은 양식업체에서 운영하고 있는 농어는 해상가두리양식의 경우인데, PEF, CIP 및 ENRO가 각각 0.004 , 0.007 및 0.143 mg/kg의 최대잔류량을 나타내었으며, ENRO를 제외하고는 잔류량이나 검출빈도가 상당히 낮았다. ENRO는 전체 시료 중 81.5%의 검출율을 나타내어 육상어류양식장 뿐만 아니라 해상어류양식장에서도 ENRO를 상당히 많이 사용하는 것으로 확인되었다.

여수지역에서는 해상가두리양식장을 대상으로 조피볼락과 농어에 대해서 항균제 잔류모니터링을 실시하였다. 시험어로 사용한 양성중인 어류의 체중과 체장은 조피볼락이 314.2 ± 14.04 g과 27.2 ± 4.0 cm 그리고 농어는 162.8 ± 24.6 g과 24.6 ± 3.0 cm이었다. 여수지역에서 검출된 fluoroquinolone계 항균제는 조피볼락에서 전체 조사 시료 중 18.2%의 검출율을 나타내었는데, PEF가 최대 0.004 mg/kg, CIP가 0.013 mg/kg 그리고 ENRO가 0.008 mg/kg이 검출되었다. 한편, 농어에서는 PEF 및 CIP가 최대 0.002 및 0.008 mg/kg이 검출되었다.

완도지역에서는 해상가두리양식장에서 조피볼락과 육상어류양식장의 넙치에 대한 항균제 잔류량 모니터링을 실시하였다. 시험어로 사용한 조피볼락의 체중은 304.2 ± 156.1 g 그리고 체장은 25.4 ± 5.2 cm이었으며, 넙치의 체중은 557.6 ± 360.5 g, 체장은 32.9 ± 6.9 cm이었으며, 조사기간 동안 양식장의 수온은 16.0-25.4°C였다. 조피볼락에 있어서 fluoroquinolone계 항균제 중 CIP이 2004년 5월부터 8월까지 매월 검출되었으나, 2004년 9월 및 10월 이후에는 검출되지 않았다. CIP의 최대 검출량은 0.018mg/kg이었는데, 이 양식장에서는 4월부터 7월까지 CIP을 사용한 것으로 확인되었다. 그러나 8월 이후에는 항균제를 사용하지 않았으며, 이후 fluoroquinolone계 항균제는 전혀 검출되지 않았다. 한편, 넙치 양식장에서는 2004년도는 fluoroquinolone계 항균제를 사용하지 않았지만, 2005년도에 ENRO를 사용하였으며, 그 결과 ENRO이 최대 0.05 mg/kg이 검출되었다. 모니터링 결과 양성단계에서 대부분의 어류양식장에서는 항균제를 사용하고 있는 것이 확인되었으며, 특히 양식 중 어류를 크기별로 재선별 한 후에는 외부상처를 치료하기 위하여 항균제를 사용하는 것으로 확인되었다.

제주지역에서는 2개 육상어류양식장을 선정하여 넙치에 대하여 항균제 잔류량 모니터링을 실시하였다. 시험어는 양성중인 어류로 체중은

308.2±186.7 g, 체장은 28.1±5.3 cm이었다. 조사기간 동안 양식장의 수온은 16.3-21.7℃였으며, 지하해수를 사용하기 때문에 여름임에도 수온은 그다지 높지는 않는 편이었다. 사료는 고등어 전갱이 등과 배합사료를 섞어 만든 Moisture pellet(MP사료)을 1일 2회 급여하고, 항균제 사용이력과 같은 양식 관리 일지를 기록하고 있었다. 본 연구조사를 위한 양식장에서의 항균제 사용이력은 2004년 5월 중순에 6일간 옥시테트라싸이클린을 경구투여 하였으며, 또한 7월 하순에 7일간 아목사실린을 경구투여한 이력도 있었지만, fluoroquinolone계 항균제의 사용기록은 없었다. 그러나 넙치에 대한 fluoroquinolone계 항균제 잔류 모니터링 결과, 3마리 시료에서 NOR이 최대 0.006 mg/kg이 검출된 것을 비롯하여 CIP 및 ENRO가 각각 15마리 시료 중에서 최대 0.072 및 0.162 mg/kg이 검출되었으나, OFL 및 PEF는 전혀 검출되지 않았다.



2) 출하전 단계 양식어류 중의 항균제 잔류량 모니터링

양식어류에 대한 항균제 오염실태 파악을 통하여 수산용 항균제의 적정 사용지침과 오남용 방지를 위한 법적 관리체제 구축을 위한 근거 자료를 확보하고자 출하단계 어류에 대한 fluoroquinolone계 항균제 잔류량 모니터링을 실시한 결과는 다음과 같다. 제주, 거제 및 완도에서 생산되어 출하된 넙치와 통영과 여수에서 생산되어 출하되는 조피볼락을 대상으로 fluoroquinolone계 항균제 5성분을 분석한 결과를 Table 12에 나타내었다. 출하단계에 있는 넙치 92마리 시료 중에서 ENRO는 27마리 시료에서 최대 0.102 mg/kg이 검출되었고, OFL은 10마리 시료에서 최대 0.09 mg/kg이 검출되어 각각 29.3% 및 10.9%의 검출율을 나타내었으나, 그 외 항균제는 거의 검출되지 않았다. 한편, 조피볼락의 경우 57마리 시료 중 OFL 및 ENRO가 각각 2마리 및 1마리 시료에서 아주 극미량이 검출되었다.

생산지역별로는 거제지역에서 생산된 넙치가 66.6%로 가장 높은 검출율을 나타내었으며, 성분별로 보면 ENRO가 43.3%로 가장 높은 검출율을 보였고, OFL이 13.3%의 검출율로 그 다음 순이었으며, CIP는 10% 정도로 시료에서 검출되었다. 제주지역에서 생산된 넙치는 34.3%의 fluoroquinolone계 항균제의 검출율을 보였지만, 통영, 여수 및 완도에서 생산된 어류에서는 그 검출율이 상당히 낮은 편이었다(Fig. 16). 검출된 fluoroquinolone계 항균제 검출율을 성분별로 비교하여 Fig. 17에 나타내었다. ENRO의 검출율이 전체 시료의 56%로 가장 높았으며, 다음이 OFL(33%)로 나타났는데, OFL은 양식단계에서 조사에서는 거의 검출이 되지 않았던 항균제 였다.

본 연구에서의 조사결과 출하단계에 있는 양식 어류에서도 fluoroquinolone계 항균제를 사용하고 있었으며, 특히 일부 양식장에서는 충분한 휴약기간을 지키지 아니하고 출하는 경우가 있는 것이 확인되었다. 따라서 조속한 시일내에 fluoroquinolone계 항균제에 대한 식품허용잔류 기준치와 분석법이 확립되고, 명료한 항균제 이용관리 기준이 마련되어야 할 것으로 생각된다.

Table 12. Range of residual fluoroquinolones in the farmed finfish at shipping step for market

Species	Local area	Size of samples		Fluoroquinolones (mg/kg)							No. of Samples
		Length (cm)	Weight (g)	OFL	NOR	PEF	CIP	ENRO			
Olive flounder	Geoje	473.8-1069.7 (672.9±152.2)	32.7-44.0 (38.2±3.1)	ND* (4)**	ND	ND	ND-0.018 (3)	ND-0.102 (13)	30		
		251.1-782.3 (507.5±143.3)	27.5-40.0 (34.4±3.3)	ND-0.052 (1)	ND	ND	ND	ND-0.067 (8)	27		
	Jeju	135.6-1405.3 (729.8±357.9)	22.0-47.0 (37.5±7.2)	ND-0.090 (5)	ND-0.076 (1)	ND	ND	ND-0.053 (6)	35		
Black rock fish	Total	646.0± 266.2	36.9±5.4	ND-0.090 (10)	ND-0.076 (1)	ND	ND-0.018 (3)	ND-0.102 (27)	92		
	Tongyeong	216.7-634.6 (435.6±125.7)	23.0-32.0 (28.2±2.9)	ND	ND	ND	ND	ND-0.002 (1)	30		
	Yeosu	265.8-608.1 (402.3±85.7)	23.5-30.0 (26.8±2.9)	ND-0.070 (2)	ND	ND	ND	ND	27		
Total	419.8±109.9	27.5±2.5	ND-0.070 (2)	ND	ND	ND	ND-0.002 (1)	57			

* Not Detected;

** No. of detected samples

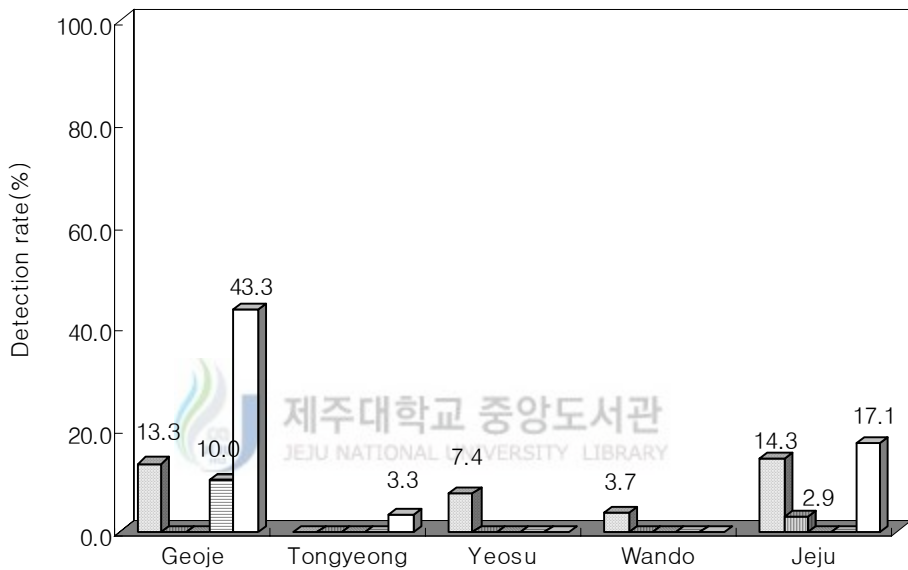


Fig. 16. Detection rate of fluoroquinolones in the farmed finfish collected from the different local area. ▨, ofloxacin; ▩, norfloxacin; ▧, pefloxacin; ▨, ciprofloxacin; □, enrofloxacin.

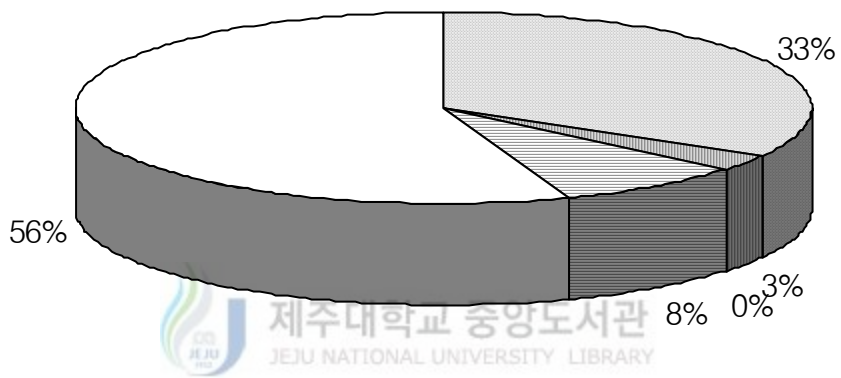


Fig. 17. Detection rate of fluoroquinolones in the farmed finfish at shipping step for market. ▣, ofloxacin; ▤, norfloxacin; ▥, pefloxacin; ▦, ciprofloxacin; ▧, enrofloxacin.

3) 양식패류 중의 플루오로퀴놀론계 항균제 오염 모니터링

우리나라에서는 수출패류의 위생안전성을 보장하기 위하여 1972년 미국과 한·미 패류위생협정을 체결한 바 있으며, 최근 일본 및 EU 등과도 위생협정을 체결하여 수출패류의 위생안전성을 보장하고 있다. 이러한 협정을 원활히 운영하기 위하여 한국패류위생관리계획을 수립 운영하고 있으며, 동 계획에 따라 수출용패류생산 지정해역을 지정고시하고 있다. 이 지정해역에 대하여 매월 1회 이상의 세균학적 조사를 실시하고 있으며, 그 외 패류독소 및 각종 이화학적 오염물질에 대해서도 정기조사를 실시하고 있다.

이 지정해역의 주변해역 및 배수유역에는 상당수의 해상 및 어류양식장이 운영되고 있고, 이 어류양식장에서 어류의 생산성 향상과 어류질병의 예방 및 치료를 위하여 항균제를 포함한 아주 다양한 항생물질을 사용하고 있다. 이들 양식시설에서 사용되고 있는 항생물질들은 지정해역 생산되는 패류를 오염시킨 가능성이 제기되고 있다. 이에 따라 본 연구에서는 수출용패류생산 지정해역을 중심으로 주변에서 사용하고 있는 항생물질들이 패류에 미치는 영향을 파악하기 위하여 양식패류중의 항균제 오염 모니터링을 실시하였다. Fluoroquinolone계 항균제는 1980년대 초기 우리나라 어류양식에 소개되어 현재 어류질병 치료를 위하여 사용량이 점차 증가하여 OTC 다음으로 많이 사용되고 있는 항생물질이다.

본 연구에서는 어류양식장에서 사용하는 fluoroquinolone계 항균제가 주변 패류양식장에 미치는 영향을 파악하여 fluoroquinolone 항균제의 사용 및 관리 기초자료로 활용하고자 하였다.

남해안 양식패류 및 어류양식장 주변에 자생하는 패류에 대한 fluoroquinolone계 항균제의 오염실태를 매월 조사하여 Table 13 및 Table 14에 나타내었다. Fluoroquinolone계 항균제 모니터링 결과 129개체의 양식 굴 중에서 4개 시료에서만 OFL 및 CIP가 검출되어 3.1%의 검출율을 나타내었

Table 13. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the oyster cultured at the farm

Month	Temp.(°C)	Fluoroquinolones (mg/kg)					Number of Samples
		OFL	NOR	PEF	CIP	ENRO	
1	6.3~10.8 (8.7)	ND*~0.042 (2)**	ND	ND	ND	ND	11
2	3.4~10.4 (7.0)	ND	ND	ND	ND	ND	13
3	4.8~10.0 (7.5)	ND	ND	ND	ND	ND	13
4	9.3~13.6 (11.8)	ND	ND	ND	ND~0.016 (1)	ND	13
5	14.9~18.7 (17.2)	ND	ND	ND	ND	ND	10
6	19.6~24.2 (22.0)	ND	ND	ND	ND	ND	8
7	18.9~23.4 (21.5)	ND	ND	ND	ND	ND	9
8	23.7~27.4 (25.5)	ND~0.046 (1)	ND	ND	ND	ND	9
9	24.1~27.3 (25.8)	ND	ND	ND	ND	ND	9
10	20.4~21.4 (20.9)	ND	ND	ND	ND	ND	8
11	17.0~18.6 (17.7)	ND	ND	ND	ND	ND	13
12	9.2~12.4 (12.4)	ND	ND	ND	ND	ND	13
Total	3.4~27.4	ND~0.046 (3)	ND	ND	ND~0.016 (1)	ND	129

* Not Detected;

** No. of detected samples

Table 14. The results of the monitoring for residual fluoroquinolones in the mussel

Month	Temp.(°C)	Fluoroquinolones (mg/kg)					Number of Samples
		OFL	NOR	PEF	CIP	ENRO	
2	3.4~10.4 (7.0)	ND*	0.030~0.031 (2)**	ND	ND	ND	2
3	4.8~10.0 (7.5)	ND	ND	ND	ND	ND	2
4	9.3~13.6 (11.8)	ND	ND	ND	0.016~0.043 (2)	ND	2
5	14.9~18.7 (17.2)	ND	ND	ND	0.015~0.018 (2)	ND	2
6	19.6~24.2 (22.0)	ND	ND	ND	ND	ND	2
7	18.9~23.4 (21.5)	ND	ND	ND	ND	ND	2
8	23.7~27.4 (25.5)	ND	ND	ND	ND	ND	2
9	24.1~27.3 (25.8)	ND	ND	ND	ND	ND	2
10	20.4~21.4 (20.9)	ND	ND	ND	ND	ND	2
11	17.0~18.6 (17.7)	ND	ND	ND	ND	ND	2
12	9.2~12.4 (12.4)	ND	ND	ND	ND	ND	2
Total	3.4~27.4	ND	ND~0.031 (2)	ND	ND~0.043 (4)	ND	24

* Not Detected;

** No. of detected samples

으며, 검출범위는 불검출-0.046 mg/kg의 낮은 농도였다. 한편, NOR, PEF, ENRO 등은 전혀 검출되지 않았다. 어류양식장 시설물에 부착되어 있는 진주담치에서는 24개 시료 중 6개의 시료에서 NOR 및 CIP이 검출되어 25.0%의 검출율을 나타내었으며, 최대 잔류농도도 0.043 mg/kg 으로 매우 낮은 농도의 수준이었다. 따라서 육상 또는 해상어류양식장에서 사용하는 항균제는 아직까지는 연안 양식패류에게까지는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었으나, 연안해역의 양식패류에서 극미량의 항균제가 검출되고 있기 때문에 관리대책이 필요하다고 판단된다.

4) 양식어류 중의 항균제 잔류 모니터링 결과 평가

2004년부터 2005년까지 부산, 거제, 통영, 여수, 완도, 제주 소재 육·해상 어류 양식장에서 양식 중인 어류를 대상으로 fluoroquinolone계 항균제 5성분에 대한 잔류 여부를 월 1회 모니터링 한 결과에 대한 평가는 다음과 같다.

대부분의 조사대상 어류양식장에서 양식과정 중에 각종 항균제를 사용하고 있는 것으로 확인되었으며, 양식 중인 어류 중에서는 CIP 및 ENRO의 검출빈도가 매우 높은 것으로 평가되었고, 대체로 어류질병이 빈번히 발생하는 하절기에 높은 것으로 조사되었다. 그러나, 출하단계의 양식어류 중에서는 항균제가 검출되지 않거나 기준치 이하인 것으로 확인되어, 항균제에 대한 양식어류의 식품위생안전상 문제로 제기될 만한 잔류량은 아닌 것으로 평가되었다. 그러나 양식 과정 중에 많이 사용되고 있지는 않지만, 식품 잔류허용량 이상이 검출되는 경우가 있어 출하 양식어류에 대해서는 보다 정밀한 모니터링이 필요한 것으로 판단되었다.

또 일부 양식장에서는 항균제가 장기간에 걸쳐 검출되는 것으로 확인되어 지속적인 항균제 사용에 따른 항균제 내성균 유발의 가능성이 상존하는

것으로 파악되었다. 따라서, 양식장 운영자에 대한 올바른 항균제 사용에 대한 정기적인 지도, 교육 및 감독이 필요한 것으로 평가되었다. 그리고 양식어류에 대하여 연중 항균제를 투여하는 양식장에 대하여 정밀조사 결과, 이러한 양식장에서는 생사료를 제조할 때 사료로부터 유입될 수 있는 감염증의 원인균을 제어하기 위하여 항균제를 첨가하는 것으로 조사되었다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 사료로부터 어류질병 원인세균 유입 가능성이 낮은 조제된 배합사료를 사용하는 것도 하나의 방편으로 생각되며, 이러한 경우 항균제 구입에 따른 경제적인 부담도 상당히 경감될 수 있을 것으로 생각된다.

대형 양식장이 소규모의 어류양식장보다 높은 항균제 검출율을 나타내었을 뿐만 아니라 종류도 다양한 항균제를 사용하고 있는 것이 확인되었다. 따라서 어류 양식장에서 사용하는 항균제의 사용에 대한 강제적인 관리시스템 마련이 필요한 것으로 생각되었다. 즉, 양식장에서는 어류질병의 예방 및 치료를 위하여 사용하는 모든 항균제의 구입 및 사용에 대한 기록을 의무적으로 유지·관리하도록 하고, 관리 당국에서는 정기적인 점검을 실시하는 것과 같은 어류양식장에서의 항균제 오·남용을 방지할 수 있는 적절하고 적극적인 관리체제 구축이 필요한 것으로 판단되었다.

현대 어류양식 산업에서는 거의 대부분의 양식장에서 항균제등 동물용 의약품을 사용하고 있기 때문에 이들을 식품으로 섭취하는 경우 잔류약물의 노출위험성이 상존하고 있어 동물용의약품 등의 위해물질에 대한 지속적인 모니터링 과 잔류예방을 위한 지도 감독이 매우 중요하다고 판단된다.

3. 수산용 동물용의약품에 대한 양식어류의 휴약기간 설정 연구

휴약기간은 양식어류에 대한 안전성 확보는 물론, 소비자에게 제품이 안전하다는 것을 인식시켜 소비에도 큰 도움을 줄 수 있을 것이다. 이러한 휴약기간의 준수는 제도적인 규제로의 효과를 기대하기보다는 생산자의 적극적인 참여가 무엇보다 중요한 것으로 생각된다.

항생물질 및 합성항균제에 대해서는 동물용 의약품 또는 사료 첨가물의 사용 시에 사용기준 등이 정해져 있다. 사용기준 등에는 어종에 따라서 사용할 수 있는 약제의 종류나 적정한 사용량, 사용방법, 그리고 휴약기간 등을 설정하고 있다. 이렇게 어종 및 약품에 따라 휴약기간을 다르게 권고하고 있는 것은 어류 체내에서 약제의 대사 등이 어종에 따라서 서로 다르기 때문이며, 질병의 치료에 과량의 약제를 투여하면 약해가 생기기 쉽고, 또한 적은 용량을 투여하면 효과가 없으며, 특히 예방을 위하여 소량의 항균제를 지속적으로 투약하는 것은 내성균을 유발할 위험이 높기 때문이다 (Okamoto, 1991; Kaji 등, 1995; Kurobane, 2000; Horie와 Nakazawa, 1995; Hayama, 1998; Heo 등, 1992).

최근 우리나라에서도 식품안전에 관심이 높아지면서 수산물 중의 최대 허용잔류 기준치를 ENRO 단독 또는 CIP과의 합한 양으로 0.1 mg/kg으로 규정 되어 있다. 그러나 아직까지 산업적으로 사용하는 fluoroquinolone계 항균제의 양식어류에 대한 휴약기간 설정 연구가 전혀 이루어지지 않은 실정에 있다.

지금까지 구명되어 있는 일부 어류 항균제 휴약기간에 있어서는 어체의 혈액을 분석하여 약물동태학적 연구에 의한 휴약기간 구명을 수행하여 왔다(Kim 등, 2002; Lewbart 등, 1997; Bowser 등, 1992). 그러나 식품위생학적 측면에서 어체 근육중에 잔류하는 항균제를 분석하는 것이 타당할 것으로 판단되었으며, 명확한 휴약기간을 위해서는 산업화 규모의 양식장에서 실

제로 사용하는 항균제를 투여한 후 분석하여 설정하여야 산업적 이용이 가능할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 가장 많이 양식되고 있는 넙치를 대상으로 fluoroquinolone계 항균제 중에서 가장 문제가 되고 있는 동물용 ENRO의 휴약기간을 구명하고자 하였다. 휴약기간은 산업적인 양식시설을 이용하여 양식 중인 넙치에 ENRO를 첨가한 사료를 경구투여하고 넙치 근육에 축적 및 배출되는 잔류농도를 측정하여 식품 중 잔류허용기준치 이하로 감소하는데 소요되는 시간으로 계산하였다.

1) 넙치의 엔로플록사신 휴약기간 설정 연구

(1) 투약한 넙치 근육중의 엔로플록사신 축적 및 배출

어류는 변온동물이기 때문에 어류에 투여된 의약품의 잔류농도 및 기간은 수온의 영향을 쉽게 받지만(McCracken 등, 1976; Kasuga 등, 1984), 실제 어류양식장에서는 어병에 대해서 수온의 영향을 고려하지 않고 투약이 행해지고 있는 실정이다. 본 연구에서는 산업현장에서 적용 가능한 휴약기간을 설정하기 위하여 수온 상승기와 하절기에 각각 수행하였다.

본 연구에서는 양식 넙치에 ENRO를 경구투여하고 어체 내에 잔류하는 ENRO과 그 대사산물인 CIP의 잔류량을 분석하여 어류 및 갑각류의 잔류허용기준치인 ENRO 및 CIP의 단독 또는 합한 양으로 0.1 mg/kg에 적용하여 휴약기간을 설정하고자 하였다.

ENRO의 휴약기간 구명을 위한 1차 시험은 전남 여수시에 위치한 국립수산과학원 시험어장에서 5월부터 9월초까지 수온 상승기에 수행하였으며 그 결과를 Table 15 및 Fig 18에 나타내었다. 시험어는 여수지역 육상양식장에서 질병이 없는 건강한 넙치를 200마리를 구입하여 1개월간 순치시킨 후 시험에 사용하였다. 시험기간 동안 사용한 시료어는 평균체중 458.4 ± 77.4 g,

Table 15. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the first examination

day	Temp. (°C)	Concentration(mg/kg)		
		ENRO	CIP	ENRO+CIP
Before feeding	16.4	ND*	ND	ND
Feeding 3-d	17.6	ND-1.42 (0.003)**	ND-0.13 (0.00)	ND-1.55 (0.00)
Feeding 6-d	16.8	0.01-1.64 (1.43)	ND-0.42 (0.15)	0.01-2.15 (1.58)
Feeding 9-d	17.1	0.01-1.64 (0.25)	ND-0.69 (0.03)	0.01-2.27 (0.28)
Depletion 3-d	17.4	0.02-1.25 (0.35)	ND-0.61 (0.06)	0.02-1.86 (0.41)
Depletion 6-d	18.3	0.01-0.79 (0.52)	ND-0.23 (0.116)	0.01-1.01 (0.66)
Depletion 10-d	19.0	ND-0.28 (0.03)	ND-0.04 (0.01)	ND-0.32 (0.03)
Depletion 15-d	20.0	ND-0.51 (0.08)	ND-0.06 (0.01)	ND-0.56 (0.09)
Depletion 20-d	20.5	0.01-0.11 (0.01)	ND-0.01 (0.00)	0.01-0.21 (0.01)
Depletion 25-d	22.0	ND-0.12 (0.07)	ND-0.01 (0.00)	ND-0.13 (0.07)
Depletion 30-d	20.9	0.02-0.12 (0.09)	ND	0.02-0.12 (0.09)
Depletion 40-d	21.7	0.03-0.20 (0.17)	0.02-0.05 (0.02)	0.05-0.22 (0.19)
Depletion 50-d	22.3	0.01-0.10 (0.07)	ND	0.01-0.10 (0.07)
Depletion 60-d	22.9	0.01-0.10 (0.06)	ND	0.01-0.10 (0.06)
Depletion 80-d	24.2	0.02-0.04 (0.03)	ND	0.02-0.04 (0.03)
Depletion 100-d	23.8	ND-0.03 (0.01)	ND	ND-0.03 (0.01)

* Not detected

** Median of detection concentration

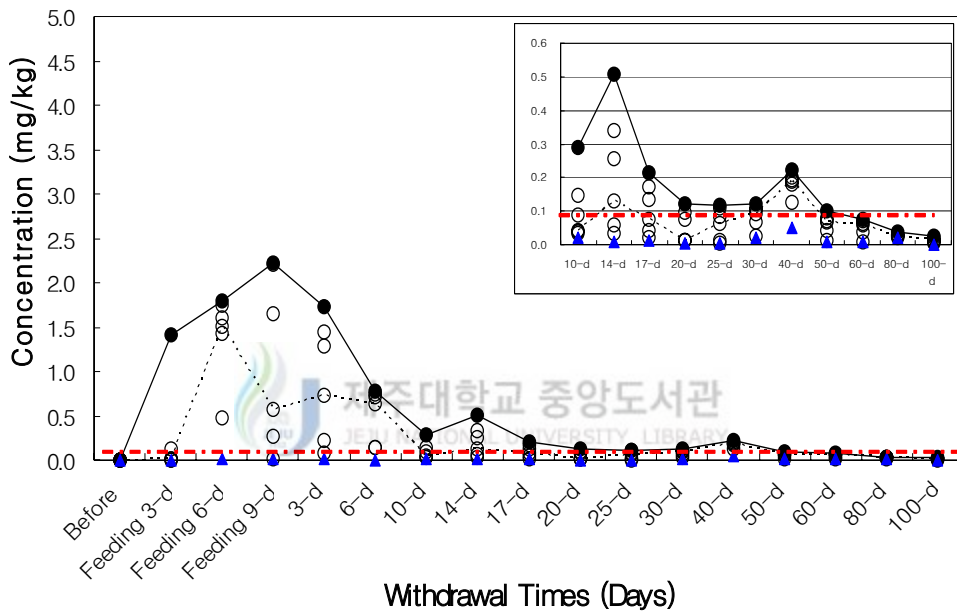


Fig. 18. Withdrawal time of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the first examination.

평균체장 34.6 ± 2.1 cm 이었으며, 양식 기간 중 어류양식장의 수온은 $16.4\text{--}23.8^\circ\text{C}$ 로 양식 중에 수온이 지속적으로 상승하는 시기였으며, 경구투여부터 휴약 100일까지 109일간 수행하였다. 경구투여에 따라 넙치 근육내 ENRO와 그의 대사물인 CIP은 축적량이 증가하여 투약 9일에 최대 2.27 mg/kg까지 축적되었으며, 어류가 활발한 먹이활동을 하는 수온이 아니어서 어체내에 축적하는 항균제의 농도가 그다지 높지않았다. 어체내 항균제 잔류량은 투약종료 3일까지 0.79 ± 0.69 mg/kg를 유지하였으나, 투약종료 후 초기에 배출되는 속도는 빨라져서 휴약 10일 후에는 0.09 ± 0.12 mg/kg 정도까지 급속하게 감소하는 경향을 나타내었다. 이후 어체내의 ENRO 및 CIP의 잔류량은 매우 완만하게 감소하여 휴약 50일 이후에도 0.1 mg/kg이하로 감소하지 않은 개체가 확인되었지만, 휴약 60일 이후에 전체 시료에서 0.1 mg/kg 이상으로 검출된 시료가 없었다. 그러나 휴약 100일 후에도 완전히 소멸되지 않고 0.01 mg/kg 정도의 극미량의 ENRO이 검출되는 시료들이 확인되었다.

ENRO의 휴약기간 구명을 위한 2차 시험은 전남 해남군의 사설 넙치양식장에서 어류의 신진대사가 왕성한 하절기인 8월부터 11월까지 수행하였으며, 그 결과를 Table 16 및 Fig. 19에 나타내었다. 시험어는 본 양식어장에서 질병 이력이 없는 양식 넙치를 선정하여 순치 없이 바로 시험에 사용하였다. 시험기간 동안 사용한 시료어는 체중 440.0 ± 84.7 g, 체장 32.6 ± 1.9 cm 이었으며, 양식 기간 중 수온은 $20.7\text{--}25.0^\circ\text{C}$ 였으며, 경구투여부터 휴약 100일까지 109일간 수행하였다.

1차 실험과는 달리 하절기에 수행한 2차 시험에서는 경구투여에 따라 ENRO 및 CIP의 축적 농도가 투약 6일째에는 최대농도가 4.30 mg/kg로 1차 시험에 비하여 2배 정도 높은 잔류량을 나타내었고, 투약 9일차에 3.96 mg/kg으로 잔류량이 경구투여 중에도 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 수온이 낮은 봄철에 비하여 수온이 높은 하절기에 어류의 신진대사가 왕성함

Table 16. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the second examination

day	Temp. (°C)	Concentration(mg/kg)		
		ENRO	CIP	ENRO+CIP
Before feeding	20.7	ND*	ND	ND
Feeding 3-d	21.1	0.01-2.96 (1.50)***	ND-0.21 (0.15)	0.01-3.17 (1.64)
Feeding 6-d	22.5	0.07-3.33 (2.93)	ND-0.33 (0.29)	0.07-3.65 (3.21)
Feeding 9-d	21.7	0.09-3.68 (1.71)	ND-0.30 (0.18)	0.09-4.00 (1.89)
Depletion 3-d	21.1	ND-1.98 (1.31)	ND-0.30 (0.21)	ND-2.24 (1.52)
Depletion 6-d	21.1	0.14-0.28 (0.24)	0.02-0.05 (0.04)	0.16-0.33 (0.27)
Depletion 10-d	23.0	ND-0.24 (0.16)	ND-0.02 (0.02)	ND-0.24 (0.18)
Depletion 15-d	24.1	ND-0.11 (0.08)	ND-0.01 (0.01)	ND-0.11 (0.09)
Depletion 20-d	23.3	0.08-0.14 (0.103)	ND-0.01 (0.00)	0.08-0.14 (0.10)
Depletion 25-d	24.7	0.05-0.08 (0.06)	ND	0.05-0.08 (0.06)
Depletion 30-d	23.2	0.02-0.06 (0.05)	ND	0.02-0.06 (0.05)
Depletion 40-d	21.4	0.02-0.05 (0.03)	ND	0.02-0.05 (0.03)
Depletion 50-d	20.2	0.01-0.03 (0.02)	ND	0.01-0.03 (0.02)
Depletion 60-d	18.7	ND-0.02 (0.01)	ND	ND-0.02 (0.01)
Depletion 80-d	15.8	ND-0.03 (0.01)	ND	ND-0.03 (0.01)
Depletion 100-d	13.0	ND-0.01 (0.00)	ND	ND-0.01 (0.00)

* Not detected

*** Median of detection concentration

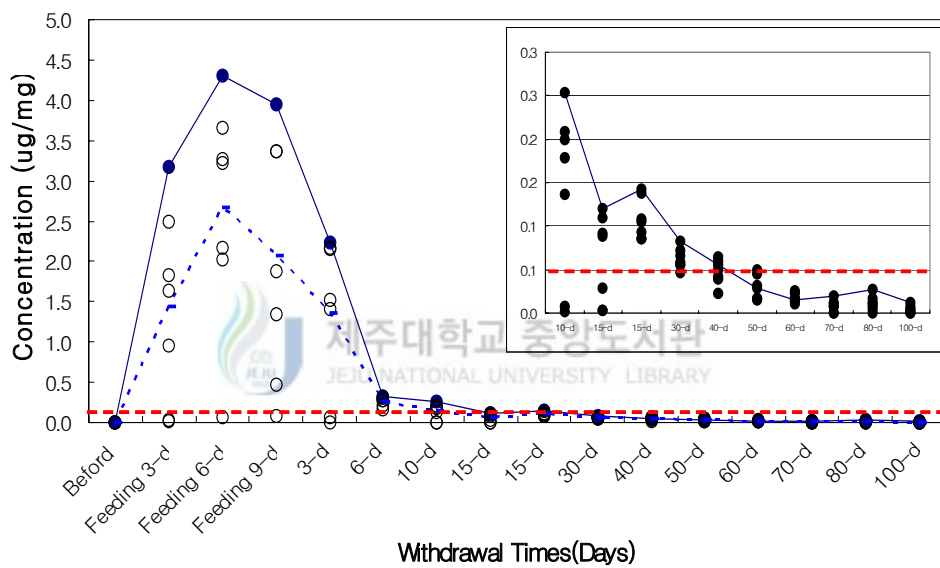


Fig. 19. Withdrawal time of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin during the second examination.

에 따라 먹이 및 항균제의 섭취량이 많아져 체내 축적량이 증가하는 것으로 추정되었다. 한편, 경구투여 이후의 어체내에서의 항균제의 감소 속도는 1차 실험과 유사한 감소 경향을 나타내어 어체내 최대 축적량에 관계없이 감소하는 속도는 비슷한 것으로 확인되었는데, 경구투여 후 10일후까지 급격하게 감소하여 휴약 20일 이후에 0.06 ± 0.05 mg/kg의 잔류량을 나타내었다. 어류 잔류허용치 0.1 mg/kg 이하로 감소되는 시기는 30일 이후였으나, 휴약 80일이 경과 후에도 0.02 ± 0.01 mg/kg의 잔류량을 나타내어 1차 시험과 마찬가지로 ENRO는 완전히 소멸되지 않는 것으로 나타났다. Tyrepenou 등 (2003)은 참돔에게 온도에 따라 sarafloxacin을 경구투여 하였을 때 25℃에서 경구투여한 경우가 18℃ 보다 높은 축적량을 나타내었으나, 배설되는 속도는 비슷하였다고 보고한 바 있으며, Lucchetti 등(2004)은 무지개 송어에 ENRO를 경구 투여하였을 때 60일 정도 지난 후에 비로소 근육중의 ENRO 잔류량이 0.1 mg/kg 이하로 감소하는 결과를 보고하여 본 연구와 비슷한 경향을 나타내었다.

따라서 본 연구에 있어서 넙치 어체중 kg당 5 mg의 ENRO를 경구투여 하였을 때 전체 시료에서 0.1 mg/kg을 초과하는 시료가 전혀 검출되지 않아 식품위생 안전에 문제가 있을 수 없는 60일이 가장 적절한 휴약기간이라고 판단된다.

(2) 엔로플록사신의 휴약기간의 계산

적절한 휴약기간을 설정하기 위하여 넙치 근육 내의 ENRO 및 CIP의 잔류량에 대한 평균간 유의성($p < 0.05$)을 검정하여 평가한 휴약기간의 적합성을 확인하였다(Table 17).

1, 2차 실험에 의한 ENRO 및 CIP의 넙치 근육내 잔류량 차이를 살펴보면, 투약기간에 따른 항균제의 잔류량은 투약 6일째가 넙치 근육 중에 가장 높게 나타났으며($p < 0.05$), 2차 조사가 1차 조사보다 높은 잔류량은 나타내었다($p < 0.05$). 이것은 일차적으로 수온에 의한 넙치의 먹이 섭취율과 개체

Table 17. Depletion of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin

day	1st Exam. (Average±S.D)	2nd Exam. (Average±S.D)
Before feeding	ND ^{c*}	ND ^b
Feeding 3-d	0.23±0.58 ^{bc}	1.45±1.19 ^a
Feeding 6-d	1.22±0.89 ^a	2.67±1.40 ^a
Feeding 9-d	0.99±1.12 ^{ab}	2.07±1.53 ^a
Depletion 3-d	0.79±0.69 ^{ab}	2.07±1.53 ^a
Depletion 6-d	0.45±0.43 ^{bc}	1.36±0.97 ^b
Depletion 10-d	0.09±0.12 ^c	0.26±0.06 ^c
Depletion 15-d	0.19±0.22 ^c	0.14±0.10 ^c
Depletion 20-d	0.05±0.05 ^c	0.06±0.05 ^c
Depletion 25-d	0.06±0.05 ^c	0.04±0.05 ^c
Depletion 30-d	0.08±0.04 ^c	0.11±0.02 ^c
Depletion 40-d	0.17±0.06 ^c	0.06±0.01 ^c
Depletion 50-d	0.05±0.04 ^c	0.05±0.01 ^c
Depletion 60-d	0.06±0.04 ^c	0.03±0.01 ^c
Depletion 80-d	0.03±0.01 ^c	0.02±0.01 ^c
Depletion 100-d	0.01±0.01 ^c	0.01±0.01 ^c

* Correlation is significance at the 0.05 level

간의 차이로 인한 것으로 판단된다. 또한 1차 실험에서보다 2차 시험에서 어체내 축적이 2배정도 높은 값을 나타낸 것은 높은 수온의 영향인 것으로 추정되었다(Fig. 20). 그러나 경구투여 종료 후에 근육중의 항균제 잔류량을 휴약기간과 온도별로 살펴보면, 휴약기간에 따른 차이는 있으나($p < 0.05$) 1차, 2차에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$). ENRO를 경구투여하는 경우 수온에 따라 근육에 축적되는 경향은 다소 차이가 나지만, 배출되는 속도에는 거의 차이가 없는 것으로 확인되었다. 즉, 넙치의 섭이가 활발히 일어나는 고수온에서 투약으로 인한 항균제 잔류량은 높았으나, 경구투여 중 항균제 잔류량의 차이와는 달리 휴약기간 동안은 6일 이후부터 근육 중의 항균제 잔류량은 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

1, 2차 시험에서 경구투여를 종료한 후, 넙치 근육 중 ENRO 및 CIP의 근육 중 잔류량의 감소속도를 구하여 Fig. 21에 나타내었고, 이 그래프에 의한 ENRO 및 CIP의 감소 방정식을 구할 수 있었다.

$$Y = 0.61 - 0.25 \times \ln|x - 0.93| \quad (1st \ exam)$$

$$Y = 0.85 - 0.38 \times \ln|x - 0.96| \quad (2nd \ exam)$$

이 방정식에 의하면 1, 2차 실험의 ENRO 및 CIP의 잔류량이 0.1 mg/kg 으로 감소되는 시기는 각각 휴약 30.3일, 30.0일로 두 실험구간에서는 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다. 앞서 밝힌 바와 같이 체내에 축적된 항균제의 농도에 관계없이 배출되는 속도는 거의 비슷한 것으로 확인되었다. 그러나 개체에 따라서는 휴약 30일 이후에도 0.1mg/kg 이상 나타나 방정식에 의한 휴약기간과는 다소 차이가 있는 것으로 나타났다. 따라서 이 방정식에 의하여 계산된 식품 잔류허용기준치 이하로 감소하는 기간에 2배에 해당하는 기간을 적정 휴약기간으로 산정하는 것이 식품안전을 고려한 적절한 휴약기간이라고 판단된다.

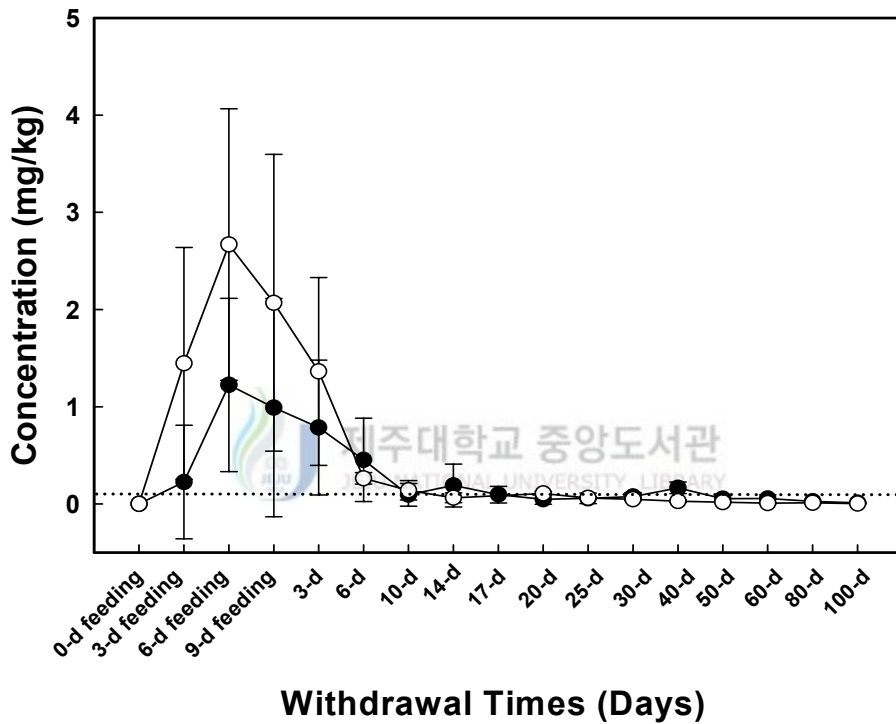


Fig. 20. Concentration-time curve of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin.
 ●, 1st Exam; ○, 2nd Exam.

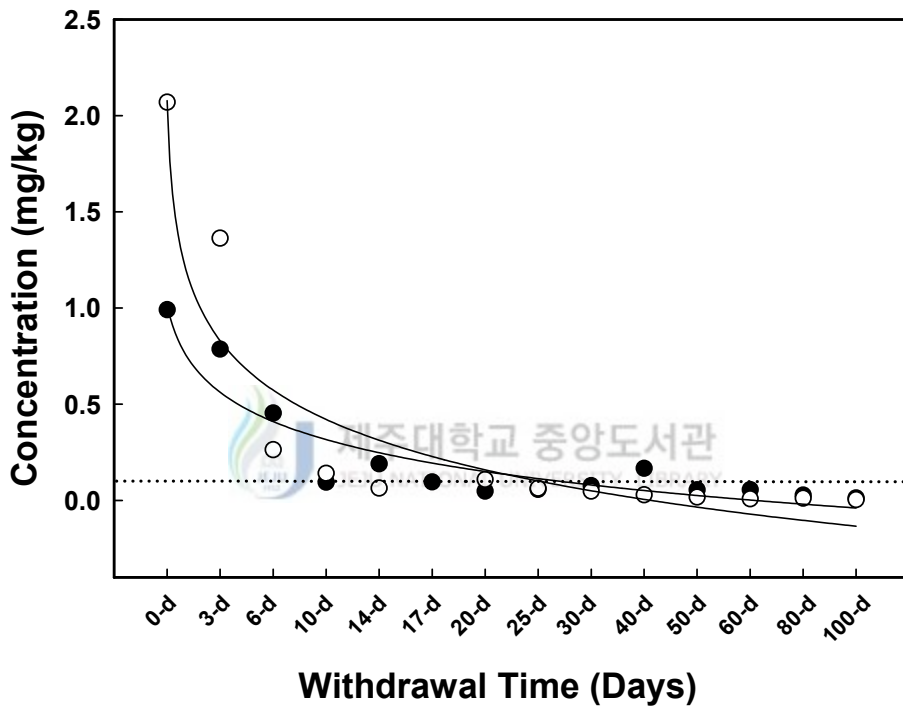


Fig. 21. Concentration-time curve of the level of enrofloxacin and ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of enrofloxacin. ●, 1st Exam; ○, 2nd Exam.

Lucchetti 등(2004)은 무지개송어를 이용하여 실제 양식조건에서 ENRO를 매일 어체 중 kg당 10 mg이 되도록 사료에 혼합하여 7일간 경구투여하였을 때 무지개 송어의 근육과 껍질에서의 ENRO는 휴약 59일이 지난 후에도 0.1 mg/kg이 잔류하고 있는 것으로 조사되어 한번 사용된 ENRO는 체내에서 배출이 매우 어렵다고 보고하였다. 또 Xu 등(2005)은 나일틸라피아를 이용하여 실제 양식조건에서 ENRO를 하루에 어체중 kg당 50 mg이 되도록 7일간 경구투여하였을 때 어체 근육중의 ENRO의 적절한 휴약기간은 22일이라고 보고하였으며, ENRO의 대사과정 중에 생성되는 CIP의 존재를 확인하였다. 본 연구에 있어서도 ENRO의 대사물로 생성되는 CIP이 검출되었으며, 휴약 50일 이후에 CIP은 완전히 배출되는 것으로 확인되었다.

본 연구에서와 같이 산업적인 규모의 양식어장을 대상에서 항균제를 투여하는 경우에 있어서의 ENRO의 적정 휴약기간은 식품위생안전을 고려할 때 60일이 적절한 것으로 판단된다. 그러나 넙치 양식 중에 사용하는 ENRO는 100일 이상 지난 후에도 어체내에 완전히 배출되지 않고 잔류하는 것이 확인되어, ENRO는 검출되어서는 안되는 항생물질로 규정하고 있는 일본 수출용 넙치는 양식과정 중에 ENRO를 사용하지 않는 것이 바람직한 것으로 생각된다.

현재 동물용의약품편람(2001)에는 넙치에 사용한 ENRO의 휴약기간을 20일로 권고하고 있지만, 본 연구의 결과에서 구명한 대로 넙치의 ENRO의 휴약기간은 60일로 확대해야 한다고 판단되었다.

2) 넙치의 시프로플록사신 휴약기간 설정 연구

(1) 투약한 넙치 근육 중의 시프로플록사신 축적 및 배출

CIP은 1980년대에 초대 개발되어 사람의 호흡기 질병, 소화기 및 요로계 질병에 대한 임상적 치료에 널리 사용되어 왔다(Kaatz 등, 1987). CIP는 기존의 quinolone계 항균제에 비하여 항균력이 우수하며 신독성 및 백내장 등의 부작용은 거의 문제가 되지 않고, 경구투여에 의한 흡수율이 높아 어류양식장에 쉽게 사용할 수 있는 장점이 있는 약제이다(Heo 등, 1998).

CIP의 항균제 휴약기간 구명을 위하여 제약회사가 다른 2가지의 CIP을 구입하여 각각 다른 수조에서 동시에 시험을 하였다.

A제약 회사의 제품을 이용하여 CIP의 휴약기간을 구명하기 위한 1차 실험은 전남 해남군의 사설 양식장에서 어류의 신진대사가 왕성하고 질병의 발생이 높은 하절기인 8월에서 9월에 실시하였으며, 그 결과를 Table 18 및 Fig. 22에 나타내었다. 시험어는 본 양식장에서 질병이 없는 양식중인 넙치를 이용하였다. 시험기간 사용한 시험어는 평균체중 449.4±76.6 g, 평균체장 32.7±1.8 cm의 것을 사용하였으며, 시험기간의 수온은 20.7-25.0℃였으며, 경구투여부터 43일간 수행하였다. A제약의 권고대로 투약한 경우 어체내에 축적되는 항균제는 0.22 mg/kg 정도였기 때문에 권고량보다 3배 많은 양을 경구투여 하였다. 경구투여 11일 후에 어체내에 최대 0.58 mg/kg이 축적되었으며, 경구 투여 13일에 다소 감소하였다. 실제 양식어장의 탐문결과 어떤 항균제에 있어서도 제약회사의 권고량에 따라 처방하여 투약하는 경우는 없고 대부분 7일 정도 투약하는 것을 확인할 수 있었다. 경구투여 종료 3일 후에 어체내 CIP의 잔류량은 0.16±0.08 mg/kg으로 급격히 감소하였고, 15일 후에는 거의 검출되지 않았다.

Guo 등(2005)의 약물동태학적 해석에 의하면 뱀장어에 CIP을 kg당 10 mg 경구 투여하였을 때 혈청 내 최대 잔류농도는 0.45 mg/kg이었으며, 배설되는 반감기는 51시간으로 보고한 바 있다.

Table 18. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the first examination

day	Temp. (°C)	Concentration(mg/kg)		
		ENRO	CIP	ENRO+CIP
Before feeding	20.7	ND*	ND	ND
Feeding3-d	21.1	0.05-0.22 (0.13)**	ND-0.01 (0.00)	0.05-0.23 (0.13)
Feeding6-d	23.0	ND-0.24 (0.11)	ND-0.02 (0.01)	ND-0.25 (0.12)
Feeding9-d	24.1	0.02-0.18 (0.17)	0.01-0.03 (0.02)	0.02-0.20 (0.18)
Feeding 11-d	24.1	0.02-0.58 (0.13)	ND-0.00 (0.00)	0.02-0.58 (0.13)
Feeding 13-d	24.1	ND-0.51 (0.03)	ND-0.01 (0.003)	ND-0.52 (0.03)
Depletion 3-d	23.3	0.00-0.25 (0.18)	ND-0.01 (0.00)	0.00-0.25 (0.18)
Depletion 6-d	24.8	0.01-0.04 (0.03)	ND-0.02 (0.00)	0.01-0.04 (0.03)
Depletion 10-d	25.0	ND-0.01 (0.00)	0.00-0.01 (0.00)	ND-0.01 (0.00)
Depletion 15-d	24.7	0.00-0.00 (0.00)	ND-0.00 (0.00)	0.00-0.01 (0.00)
Depletion 20-d	24.2	0.00-0.01 (0.00)	ND	0.00-0.01 (0.00)
Depletion 25-d	23.2	ND	ND	ND
Depletion 30-d	22.4	ND	ND	ND

* Not detected

** Median of detection concentration

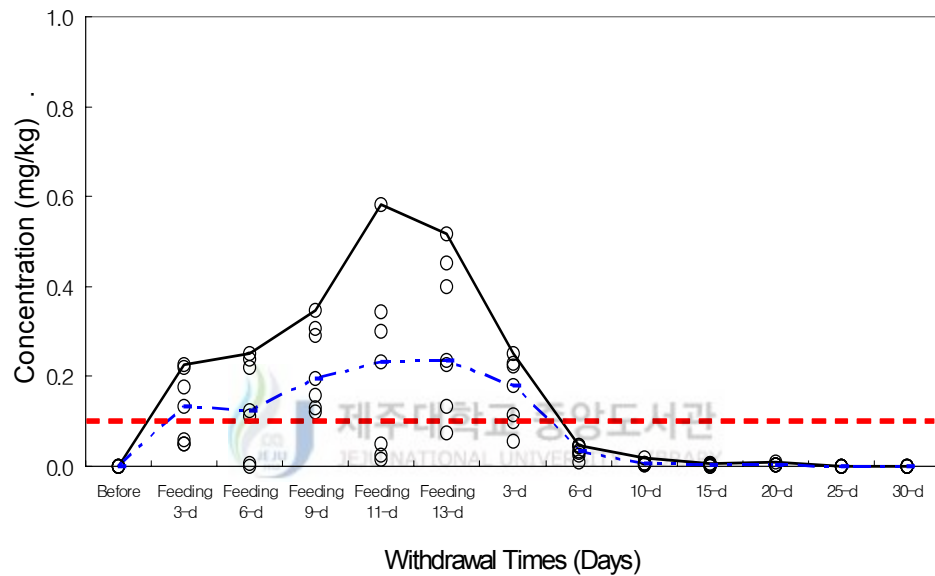


Fig. 22. Withdrawal time of the ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the first examination.

B제약 회사의 CIP 제품을 이용하여 2차로 수행한 휴약기간 시험 결과는 Table 19 및 Fig. 23에 나타내었다. 경구투여 13일에 어체내 축적량은 최대 0.73 mg/kg을 나타내었으나 투약 종료 6일 후 0.1 mg/kg이하로 감소하였으며, 10일 이후에 0.01 mg/kg이하로 감소하였고, 휴약 25일 후에는 전혀 검출되지 않아 CIP은 ENRO에 비하여 어체에 축적되는 양이 상당히 적고, 배출되는 시간도 매우 빠른 것을 확인할 수 있었다. 따라서 CIP을 경구투여한 넙치의 휴약기간은 식품위생안전 확보 등을 위하여 최소 15일이 적절한 것으로 판단된다.

(2) 시프로플록사신의 휴약기간의 계산

투약기간과 항균제 제조회사에 따른 항균제 잔류량 차이를 분산분석을 이용하여 조사한 결과를 Table 20에 나타내었다. 투약기간과 항균제 제조회사에 따라 넙치근육 중의 항균제 잔류량은 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 항균제 잔류량은 투약 9일까지 증가하였으며, 그 이후에는 유의적인 차이를 보이지 않고 있다. 그리고 제약회사에 따른 넙치 근육 중의 항균제 잔류량은 1차 실험의 A사보다는 2차 실험의 B사 항균제를 사용할 때 투약기간동안 높은 잔류 함량을 나타내었다($p < 0.05$).

항균제의 경구투여에 따른 넙치 근육중의 항균제 잔류량을 측정한 결과를 Fig. 24에 나타내었다. 어체내 잔류 농도와 제조회사에 따라 모두 유의적인 차이를 나타내었으며($p < 0.05$), 휴약 6일이후부터는 개체별에 따른 다소 차이는 있으나 기간별에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다($p > 0.05$). 그러나 B사의 항균제를 사용한 넙치가 A사의 항균제를 사용한 넙치보다 근육 중의 항균제 잔류량은 휴약기간 동안 높은 함량을 나타내었다($p < 0.05$). 항균제의 잔류량을 투약기간과 항균제 제조회사에 따른 차이를 분산분석을 이용하여 조사한 결과, 투약기간과 항균제 제조회사에 따라 넙치근육 중의 항

Table 19. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the second examination

day	Temp. (°C)	Concentration(mg/kg)		
		ENRO	CIP	ENRO+CIP
Before feeding	20.7	ND*	ND	ND
Feeding 3-d	21.1	ND-0.30 (0.17)**	ND	ND-0.30 (0.17)
Feeding 6-d	23.0	0.02-0.52 (0.28)	ND-0.03 (0.01)	0.02-0.55 (0.29)
Feeding 9-d	24.1	0.26-0.58 (0.38)	ND-0.01 (0.00)	0.27-0.59 (0.39)
Feeding 11-d	24.1	0.37-0.66 (0.61)	ND-0.01 (0.00)	0.37-0.66 (0.61)
Feeding 13-d	24.1	0.11-0.73 (0.51)	ND-0.00 (0.00)	0.12-0.73 (0.52)
Depletion 3-d	23.3	0.20-0.59 (0.30)	ND	0.20-0.59 (0.30)
Depletion 6-d	24.8	0.00-0.10 (0.04)	ND-0.00 (0.00)	0.00-0.10 (0.04)
Depletion 10-d	25.0	0.00-0.01 (0.01)	ND-0.00 (0.00)	0.00-0.01 (0.01)
Depletion 15-d	24.7	0.00-0.01 (0.01)	ND-0.00 (0.00)	0.00-0.01 (0.01)
Depletion 20-d	24.2	0.00-0.00 (0.00)	ND	0.00-0.00 (0.00)
Depletion 25-d	23.2	ND	ND	ND
Depletion 30-d	22.4	ND	ND	ND

* Not detected

** Median of detection concentration

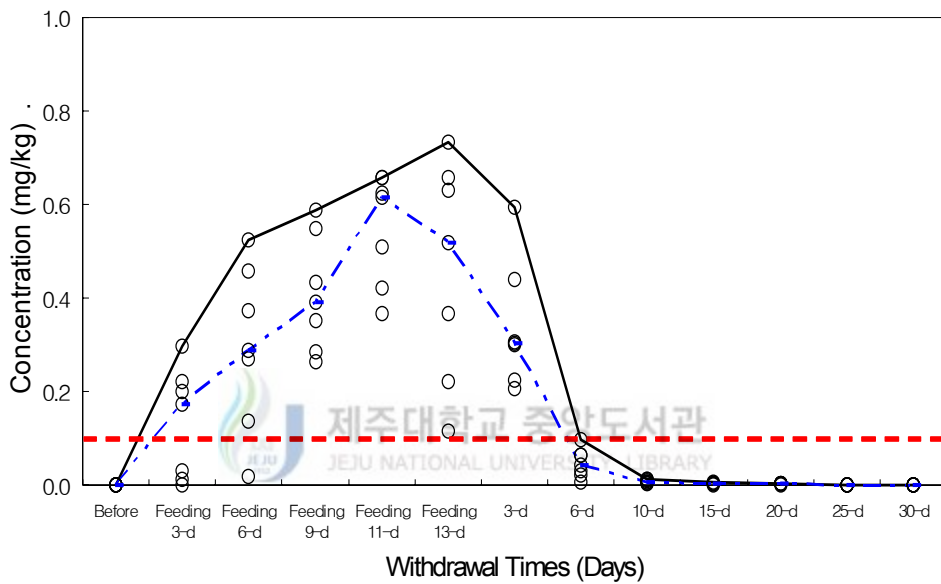


Fig. 23. Withdrawal time of the ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin during the second examination.

Table 20. Depletion of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin

day	1st Exam. (Average±S.D)	2nd Exam. (Average±S.D)
Before feeding	0 ^{c*}	0 ^c
Feeding 3-d	0.13±0.08 ^{bc}	0.13±0.12 ^c
Feeding 6-d	0.12±0.12 ^{bc}	0.30±0.18 ^b
Feeding 9-d	0.22±0.09 ^{ab}	0.41±0.12 ^{ab}
Feeding 11-d	0.22±0.21 ^{ab}	0.55±0.12 ^a
Feeding 13-d	0.29±0.17 ^a	0.46±0.23 ^a
Depletion 3-d	0.16±0.08 ^b	0.34±0.14 ^b
Depletion 6-d	0.03±0.01 ^c	0.05±0.03 ^c
Depletion 10-d	0.01±0.01 ^c	0.01±0.00 ^c
Depletion 15-d	0 ^c	0 ^c
Depletion 20-d	0 ^c	0 ^c
Depletion 25-d	0 ^c	0 ^c
Depletion 30-d	0 ^c	0 ^c

* Correlation is significance at the 0.05 level

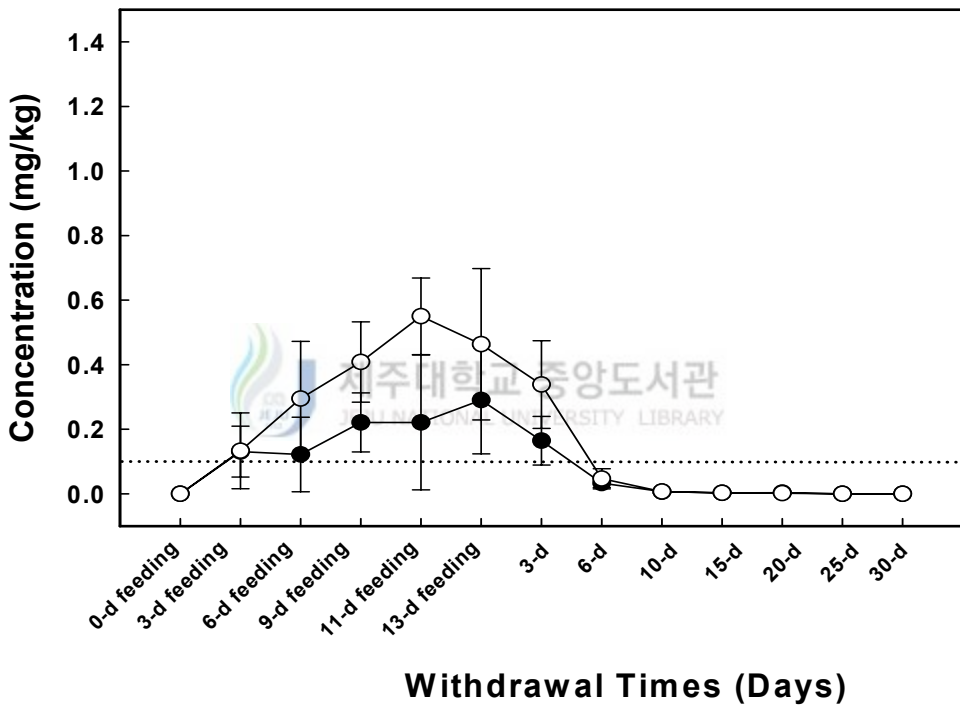


Fig. 24. Concentration-time curve of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin. ●, 1st Exam; ○, 2nd Exam.

균제 잔류량은 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 그러나 항균제 잔류량은 투약 9일까지 증가하였으며, 그 이후에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 그리고 제약회사에 따른 넙치 근육 중의 항균제 잔류량은 A사보다는 B사의 항균제를 사용할 때 투약기간동안 높은 함량은 나타내었다($p < 0.05$).

1, 2차 시험에서 경구투여를 종료한 후, 넙치 근육 중 CIP의 근육 중 잔류량의 감소속도를 구하여 Fig. 25에 나타내었고, 이 그래프로부터 ENRO 및 CIP의 감소 방정식을 구할 수 있었다.

$$Y = 0.13 - 0.78 \times \ln|x - 0.88| \quad (A \text{ Company})$$

$$Y = 0.26 - 0.16 \times \ln|x - 0.73| \quad (B \text{ Company})$$

이 식에 의하면 0.1mg/kg 이하의 농도를 나타내는 기간은 1차 시험은 4일 이후이며, 2차 시험은 7일 이후로 나타났지만, 적정 휴약기간은 이 방정식에 의하여 계산된 식품 잔류허용기준치 이하로 감소하는 기간에 2배에 해당하는 기간으로 산정하는 것이 식품안전을 고려한 적절한 휴약기간이라고 판단된다. 따라서 식품위생안전을 고려한 CIP의 안전 휴약기간은 15일 정도가 적당하다고 판단된다. 제조회사에 따라 체내에 축적 및 배출되는 속도가 약간씩 차이가 나는 것으로 나타났다. 즉, 2차로 시험한 B사의 항균제를 사용하였을 때가 어류 근육중에 항균제가 0.1mg/kg 이하로 감소하는데 걸리는 기간이 1차로 시험한 A사의 것보다 시간이 소요되는 것을 확인할 수 있었지만 유의차는 없었다.

본 연구에서와 같이 산업적인 규모의 양식어장을 대상에서 항균제를 투여하는 경우에 있어서의 CIP의 적정 휴약기간은 식품위생안전을 고려할 때 15일이 적절한 것으로 판단된다. 그러나 넙치 양식 중에 사용하는 CIP는 ENRO과는 달리 어체내에 잔류하는 기간이 상당히 짧았으며, 미량도 잔류하지 않고 완전히 배출되는 항균제로, 또는 잔류되더라도 적절한 휴약기간을 지키면서 사용한다면 식품위생적으로 문제가 되지 않을 것으로 사료된다.

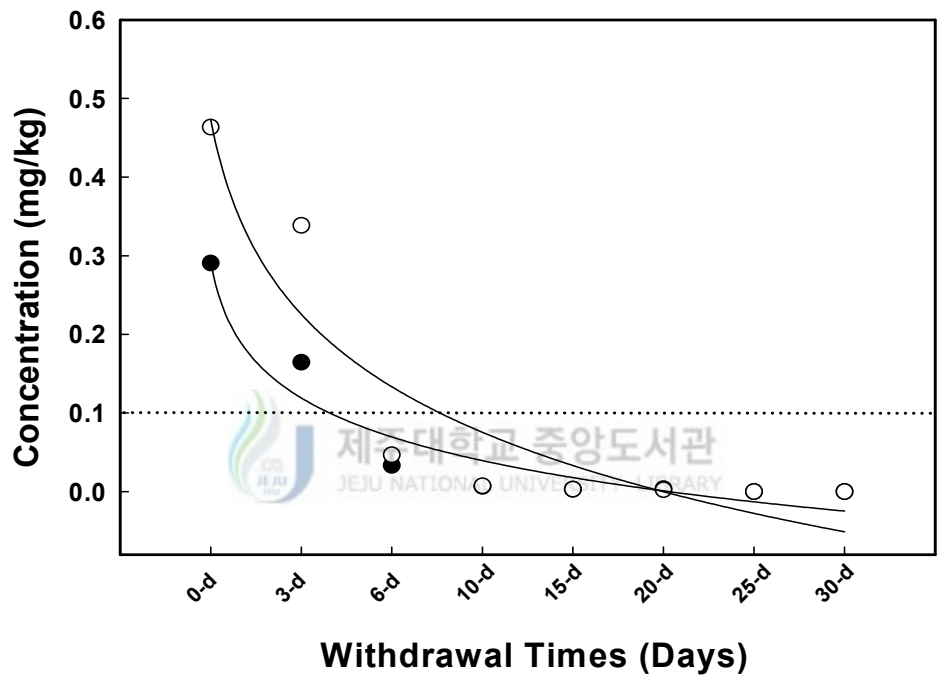


Fig. 25. Concentration-time curve of the levels of ciprofloxacin in the muscle of olive flounder after oral administration of ciprofloxacin. ●, 1st Exam; ○, 2nd Exam.

IV. 요약

우리나라에서 산업적 규모의 어류양식이 1980년대에 시작된 이후 양식 어류의 생산량은 매년 증가 추세에 있으며, 이러한 양식어 생산량의 증대에는 어류 질병의 치료 및 예방을 위한 수산용 약제의 적절한 사용이 큰 역할을 한 것으로 생각된다. 우리나라에서 판매되고 있는 약 30여 종의 수산용 의약품 중 약 60%는 tetracycline계열이 차지하고 있으나, 장기간에 걸친 사용으로 인한 내성균 출현 등으로 약제의 효과는 현저히 떨어지고 있는 실정이다. 이에 따라 일부에서는 ciprofloxacin, enrofloxacin 등의 fluoroquinolone계 항균제가 사용되고 있다.

Fluoroquinolone계 항균제는 세균의 DNA-gyrase 활성을 억제하여 DNA의 복제를 저해함으로써 광범위한 살균작용을 나타내는 합성항균제로 생체에서 흡수가 잘되고 강한 항균력을 나타내므로 사람이나 동물 질병의 치료 및 예방에 널리 이용되고 있다. 또한, fluoroquinolone계 항균제는 광범위한 항균효과를 나타내므로 어류의 세균성 질병 치료에 매우 효과적이기 때문에 최근 어류양식장에서 사용량이 점차 증가하고 있다.

어류 양식과정에 fluoroquinolone계 항균제가 사용됨에 따라 상업적으로 출하되는 양식어에서의 항균물질의 잔류 가능성이 있으나 어패류 중의 fluoroquinolone계 항균제의 분석법은 확립되어 있지 않다, 또한 어류에 약제를 투약 후 가식부에서 약제가 식품위생학적으로 안전한 수준까지 저하하는데 소요되는 기간(휴약기간)도 명확하지 않다.

본 연구에서는 HPLC를 이용하여 어패류 중에 잔존하는 fluoroquinolone계 항균제 ofloxacin (OFL), pefloxacin (PEF), norfloxacin (NOR), ciprofloxacin (CIP) 및 enrofloxacin (ENRO) 등 5종에 대한 동시 분석법을 개발하고, 개발된 분석법의 효율성 검정을 위하여 연안해역 양식어류에 대한 fluoroquinolone계 항균제 잔류모니터링을 실시하였으며, 양식어류의 위생안

전 확보를 위하여 양식넙치에 대한 ENRO 및 CIP의 휴약기간 설정 연구를 실시하였다.

1. 본 연구에서 개발한 HPLC를 이용하여 어패류 중의 fluoroquinolone계 항균제 5성분을 동시에 분석할 수 있는 HPLC 분석조건은 C₁₈역상칼럼 (4.6×250 mm, 5 μm)을 사용하여, 이동상 0.01M phosphoric acid(pH 2.5)와 acetonitrile을 91:9로 혼합한 용액 1L 당 THF(tetrahydrofuran)를 5 mL 첨가한 용액으로, 분당 1 mL의 유속으로 흘리고, Ex 280 nm, Em 450 nm의 형광검출기를 사용하여 분석하였을 때가 가장 좋았다. 이때 어패류 중에 잔류하는 fluoroquinolone계 항균제는 마쇄한 어패류를 80℃에서 10분간 가열처리하여 단백질을 제거하고, hexan을 이용하여 지질성분 및 저분자 색소물질 등의 방해물질을 제거하는 처리법을 고안하였다.

2. 최적 분석조건에서의 각 항균제의 retention time은 OFL 23.3±0.15 min, NOR 24.9±0.11 min, PEF 26.0±0.09 min, CIP 28.6±0.08 min 및 ENRO 42.3±0.07 min 로 각 성분간에 간섭 없는 peak를 얻을 수 있었으며, 검출한계(LOD)는 OFL이 0.005 mg/kg, 그 외 항균제는 0.001 mg/kg이었다.

3. 어패류 중에 fluoroquinolone계 항균제 표준물질을 0.05-0.5 mg/kg을 첨가하여 처리하였을 때 각 수산물의 회수율은 넙치의 경우 72-110%로 가장 높았고, 다음이 뱀장어로 70-107%였으며, 새우 72-96%, 굴 76-92%의 순이었다. 분석결과 변이계수(coefficient of variation, CV) 값은 10% 미만을 나타내어 정확도와 신뢰도가 높은 분석결과를 얻을 수 있었다.

4. 우리나라 남해안 주요 어류양식장에서는 fluoroquinolone계 항균제가

사용되고 있었으며, 그 중 ENRO과 CIP의 검출율이 가장 높았다. 양식 넙치 중에서는 불검출-0.859 mg/kg의 범위로 70.3%의 시료에서 검출되었으며, 농어에서는 불검출-0.143 mg/kg의 범위로 48.1%가 검출되었다. 조피볼락과 참돔에서는 0.1 mg/kg 이하의 낮은 농도로 검출되었다.

5. 양식어류에서 월별 fluoroquinolone계 항균제의 검출율은 4월에 40%였던 것이 하절기로 갈수록 높아져 8월에는 60%이상의 시료에서 항균제가 검출되었으며, 9월 및 10월에는 다소 감소하는 경향을 나타내었다. Fluoroquinolone계 항균제는 연중 검출되고 있지만, 주로 하절기인 6-9월에 집중적으로 많이 사용하고 있는 것이 확인되었다.

6. 연안해역에서 양식되고 있는 굴에서의 fluoroquinolone계 항균제의 검출농도는 최고 0.046 mg/kg이 확인되었으나, 3.9%의 시료에서만 검출되었다. 또한 특정한 시기 및 지역에 한정되지 않고 산발적으로 검출되었으며, OFL 및 CIP만 검출되었고, NOR, PEF, ENRO 등은 전혀 검출되지 않았다.

7. 양식 넙치에 ENRO를 어체중 kg당 5 mg이 되도록 습사료를 제조한 후 9일간 경구 투여하였을 때 근육 중 ENRO와 그 주요 대사물인 CIP의 잔류 농도는 경구투여 6일까지 급격하게 증가하여 최대 4.3 mg/kg을 나타내었으며, 경구투여 종료 후 15일까지 급속하게 배출되었다. 그 이후 50일까지 거의 감소하지 않았으며, 60일 이후에 우리나라 식품위생법에서 정하고 있는 허용잔류기준치인 0.1 mg/kg 이하로 감소하였다. 따라서 식품위생안전을 고려한 ENRO의 휴약기간은 60일 정도가 적절하다고 판단되었다.

8. 양식 넙치에 CIP를 어체중 kg당 5 mg이 되도록 습사료를 제조한 후

13일간 경구투여 한 경우, 근육 중의 CIP는 경구투여 중 지속적으로 축적되어 최대 0.73 mg/kg까지 축적되었다. 경구투여 종료 후 6일까지 전 시료에서 0.1 mg/kg 이하로 급격하게 감소하였다. 따라서 식품위생안전을 고려한 CIP의 휴약기간은 15일 정도가 적절하다고 판단된다.



참고문헌

- Barbosa, J., R. Berges and V. Sanz-Nebot, 1998. Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography effect of pH and evaluation of ionization constants. *J. Chromatog. A*, 823, 411-422.
- Barry, C., 1993. The analytical testing followed by laboratory services division of agriculture Canada for veterinary drug residues in eggs. In proceedings of the euroresidues II Conference on residues of veterinary in food. The Netherlands, pp.170-175.
- 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.
- Bowser, P.R., G.A. Wooster and J. Leger, 1992. Pharmacokinetics of enrofloxacin in fingerling rainbow trout. *J. Vet. Pharmacol. Ther.*, 15, 62-71.
- Choi, K.E., J.E. Chung and M.M. Kim, 2002. Relationship between concentrations and phototoxicity of fluoroquinolones in mice. *J. Appli. Pharm.*, 10, 274-280.
- 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.
- 동물용의약품편람, 2001. 동물용의약품협회. 경성문화사, 경기도, pp.683-732.
- Ellingsen, O.F., B. Midttun, A. Rogstad, C. Syvertsen and O.B. Samuelsen, 2002. Dosage regime experiments with oxolinic acid and flumequine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) held in seawater. *Aquaculture*, 209,

19-34.

- 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.
- Espinosa-Mansilla, A., A. Munoz 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.
- EU (Commission of the European Communities), 1998. Commission Regulation (EC) No. 2728/98 of 17 December 1998 amending Annexes I, II and III to Council Regulation(EEC) No. 2377/90 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Official Journal L 205
- FDA, 2003. Approved animal drug products by center for veterinary medicine, NADA 140-828, 21 CFR 520.813. USA.
- 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.
- Guo, L., Z. Xie, X. Lin, X. Wu, B. Qiu, Y. Zhang, H. You and G. Chen, 2005. Pharmacokinetics of ciprofloxacin in eels by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Analytical Biochemistry*, 341 275-279.
- 국립수산과학원. 2002, 양식어업인을 위한 수산용 약품사용안내. 11pp.

- Hayama, T., 1998. Residues of animal drugs in food. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 39, J6-J11.
- 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(2, 3), S7-S19.
- Heo, G.J. and J.H. Kim, 1994. A study on efficacy and safety of antibacterial (pefloxacin methanesulfonate) to cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Paralichthys olivaceus*. *Kor. J. Vet. Res.*, 34, 153-1994.
- 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, G.J., S.C. Park and D.W. Kim, 1998. A study on efficacy and safety of quinolone antibacterial (Ciprofloxacin) to bacterial diseasea in cultured fish, *Cyprinus caprio* and *Oncorhynchus mykiss*. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, 22, 175-186.
- Heo, J.H., M.H. Jung, M.H. Cho, G.H. Kim, K.C. Lee, J.H. Kim and T.S. Jung, 2002. The epidemicological study on fish diseases in the southern Area of Kyeognam. *J. Vet. Clin.*, 19, 14-18.
- Herikstad, H., P. Hayers, M. Mokhtar, M.L. Fracaro, E.J. Threlfall and F.J. Angulo, 1997. Emerging quinolone-resistant Salmonella in the United States. *Emerging Infect. Dis.*, 3, 371-372.
- 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, 1994. Simultaneous determination of benofloxacin, danofloxacin and ofloxacin in chicken tissues by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 653, 69-76.

- Horie, M. and H. Nakazawa, 1995. Current Legal Regulations of veterinary drugs and their residual analysis. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 36, 329-343.
- 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.
- Horie, M.K. S.Y. Hoshino, H. Terada and H. Nakazawa, 1997. Simultaneous determination of enrofloxacin and its primary metabolite ciprofloxacin in meat and fish by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 38(5), 329-334.
- Horie, M., H. Takegami, K. Toya and H. Nakazawa, 2003. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 492, 187-197.
- 전임기, 2000. 뉴밀레니엄과 증양식산업의 기술개발 방향, *수산탐구*, 1, 16-22.
- 정승희, 김진우, 박미선, 2000. 어류체내 잔류물질 검사법. 국립수산과학원, pp.21-53.
- Jo, M.R., 2003. Determination of quinolone antibacterials and their pharmacokinetics in cultured fish. Ph. D. Thesis, Kyungsoong University. 112 pp.
- 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, 753-758.
- Kaji, Y., T. Mitsuoka and K. Mitsumori, 1995. Maximum residue levels(MRLs) concept for verterinary drugs used in food producing animals. *Food Sanitation Research*, 45, 39-52.

- 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.
- Kasuga, Y., A. Sugitani, F. Yamada, M. Arain and S. Moridawa, 1984. Oxolinic acid residues in tissues of cultured rainbow trout and ayu fish. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 25, 512-615.
- 김윤, 2001. 기르는 어업 연구현황과 향후방향. *수산탐구*, 2, 4-8.
- Kim, J.W. S.H. Jeong, J.S. Lee, D.L. Choi and M.R. Jo, 2002. Effect of temperature on the Pharmacokinetics of Norfloxacin in Carp (*Cyprinus carpio*) and Eel (*Anguilla japonica*). *J. Fish. Pathol.*, 15, 49-56.
- Kim, J.M., J.U Choi, H.O. Ku, G.S. Jeong and M.H. Lee, 2004. High performance liquid chromatographic separation of the ciprofloxacin, enrifloxacin and norfloxacin in veterinary medicines. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.*, 28, 7-14.
- Koga, H., A. Itoh, S. Murayama, S. Suzue and T. Irikura, 1980. Structure-activity relationships of antibacterial 6, 7- and 7, 8-disubstituted 1-alkyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic acids. *J. Med. Chem.*, 23, 1358-1363.
- Kurobane, S., 2000. The amendment of the maximum residue limits for verterinary drugs used in food producing animals. *Food sanitation research*, 50(5), 37-44.
- Lee, S.N. and J.K. Hong, 2004, Analytical Method of antibiotics in food and aqueous sample. *Anal. sci. Thechnol.*, 17, 43-58.
- Lee, M.H and K.S. Shin, 1990. Control of chemical residues in animal foods, Problemes and their countermeasures. *Kor. J. food Hyg.*, 5(3), 139-158

- 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.
- Lewbart, G. S. Vaden, J. Manugh, D. Whitt, A. Doi, T. Smith and K. Flammer, 1997. Pharmacokinetics of enrofloxacin in red pacu (*Colossoma brachypomum*) after intramuscular, oral and bath administration. *J. Vet. Pharm. Therap.*, 20, 124-128.
- Lucchetti D. L. Fabrizi, E. Guandalini, E. Podesta, L. Marvasi, A. Zaghini and E. Coni, 2004. Long Depletion Time of Enrofloxacin in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48, 3912-3917.
- Maraschillo, C., E. Cusido, M. Abellan and J. Vilageliu, 2001. Validation of an analytical procedure for the determination of fluoroquinolone ofloxacin in chicken tissues. *J. Chromatogr., B.*, 754, 311-318
- McCracken, A., S. Fidgeon, J.J. O'Brien and D. Anderson, 1976. An investigation of antibiotic and drug residues in fish. *J. Applied Bacteriol.*, 40, 61-66.
- 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.
- Mitsuyama, J., 1999. Structures of existing and new quinolones and relationship to bactericidal activity against *Streptococcus pneumoniae*. *J. Anti. Chem.*, 44, 201-207
- Morales-Munoz, S., J.L. Luque-Garcia, M.D. Luque de Castro, 2004. Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorimetric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples. *J. Chromatogr. A*, 1059, 25-31.
- Nagao, M., T. Tsukagata, S. Jaroenpoj and C. Ardsoongnearn, 1998. A simple analytical method for residual new quinolones in meats by HPLC. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, 39, 229-332.

- Okamoto, A., 1991. The present situation of the use of animal drugs in aquaculture. *Food Sanitation Research*, 41, 43-50.
- 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. *Analytica. Chemica. Acta.*, 483, 81-89.
- Rigos, G., I. Nengas, M. Alexis, A.E. Tyrpenou and G.M. Troisi, 2003. Tissue distribution and residue depletion of oxolinic acid in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sharpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in-feed dosing. *Aquaculture*, 224, 245-256.
- Samanidou, V.F., C.E. Demetriou, I.N. Papadoyannis, 2003. Direct determination of four fluoroquinolone, enrofloxacin, norfloxacin, ofloxacin and ciprofloxacin, in pharmaceuticals and blood serum by HPLC. *Analy. Bioanaly. Chem.*, 375, 623-629.
- 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.

- Skjølstrup, J., E. McLean, P.H. Nielsen and J.O. Frier, 2000. The influence of dietary oxolinic acid on fluidised bed biofilter performance in a recirculation system for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 183, 255~268.
- Smith, K.E., J.M. Besser, C.W. Hedberg, F.T. Leano, J.B. Bender, J.H. Wicklund, B.P. Johnson, K.A. Moore and M.T. Osterholm, 1999. Quinolone-resistant *Campylobacter jejuni* infections in Minnesota. *The New Engl. J. Med.*, 340, 1525-1532.
- 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. *Kor. 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. 120 pp .
- Stahlmann, R. and Lode H., 1999. Toxicity of quinolones. *Drugs*, 58(S2), 37-42.
- Tyrpenou, A.E., E.G. Iossifidou, I.E. Psomas and D.D. Fotis, 2003. Tissue distribution and depletion of sarafloxacin hydrochloride after in feed administration in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*, 215, 219-300.
- Ueno, R., 1999. Tissue Distribution of fish drug sulfamonomethoxine. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 65, 908-999.
- Wang, J.C., 1996. DNA topoisomerases. *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 635-692.

- 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.
- Wolfson, J.S. and D.C. Hooper, 1991. Overview of fluoroquinolone safety. *The American Journal of Medicine*, 91. S153-S161.
- Xu, W., X. Zhu, X. Wang, L. Deng and G. Zhang, 2006. Residues of enrofloxacin, furazolidone and their metabolites in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 254, 1-8.
- 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.
- Yun, S.M., C.M. Lim, B.H. Cho, M.L. Keom, M.B. Kim and S.W. Son, 2003. Development of multi-residue high-performance liquid chromatography for the determination of fluoroquinolones in eggs. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth*, 27, 177-182.

감사의 글

어떻게 이 감사한 마음을 다 글로써 표현할 수 있을 있겠습니까만, 오늘 저를 이 자리에 있게 해주시고 부족한 저에게 이 논문이 완성될 수 있도록 세심한 지도와 따뜻한 격려로 아낌없는 사랑을 주신 하진환 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 저에게 늦었지만 꿈을 이루게 해주시고 이끌어 주신 김수현 교수님의 은혜에 감사드립니다. 또한 바쁜 일정 속에서도 부족한 논문이 완성될 수 있도록 면밀한 검토와 조언을 주신 강영주 교수님 그리고 고영환 교수님께 진심으로 감사드립니다. 또한 찾아보면 항상 반가운 마음으로 아낌없는 성원과 격려를 보내주셨던 송대진 교수님 임상빈교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

짧지 않은 시간동안 이 연구를 수행할 수 있도록 많은 시간과 기회를 배려해주시고 격려와 응원을 아끼지 않으신 이태식 팀장님, 이희정연구관님, 김지희연구관님께 무한한 감사를 드리며, 앞으로 더욱 노력할 것을 마음 깊이 다짐합니다. 논문이 완성될 때까지 자신의 일처럼 실험에 임해준 조미라 박사님께 심심한 감사를 드리고, 항상 곁에서 아낌없는 성원과 위로를 보내주셨던 손광태 박사님, 오은경 박사님 목종수 박사님, 유홍식 박사님, 심길보 박사님께 고마운 마음을 깊이 간직하고자 합니다. 실험을 위하여 불철주야 힘써주고 늘 가까이서 아낌없이 도움을 준 신순범 연구사님, 박큰바위 연구사님, 유혜진님, 장수선님을 비롯하여 김주경님, 김선경님, 황혜진님에게도 감사의 말씀을 드립니다. 그리고 멀리 해남에서 휴약기간 실험을 위하여 자식 같은 넉치와 양식장을 기꺼이 지원해주신 이기호 사장님을 비롯한 사원들, 바쁜 중에도 실험에 차질 없이 시료를 지원해 주신 김현욱 친구, 그리고 항상 말없이 응원과 격려로 힘을 분똥아 준 친구 박찬준, 조수역, 이정석에게도 깊은 감사를 드립니다.

바쁘다는 핑계로 자주 찾아뵙지도 못하는 불효한 아들을 항상 따뜻한 사랑으로 감싸주시고 편하게 공부하게 보살피 주신 아버지 어머니께 이 영광을 드립니다. 그리고 항상 따뜻하고 인자한 말씀으로 이끌어 주신 장인, 장모님께도 감사의 말씀을 올립니다. 만이로써 동생들을 잘 돌보지 못하였지만, 그래도 믿고 잘 따라주고 깊은 우애를 자랑하는 우리 형제들 미선이 내외, 견호 내외, 유호 내외와도 이 기쁨을 같이하고자 합니다. 그리고 수시로 격려와 위로로 응원을 아끼지 않은 신학철형님 내외, 신인철 내외 모두 감사드립니다. 대학시절 그 어렵던 때부터 항상 사랑과 인자함으로 보살피 주시어 오늘이 있게 해주신 큰고모님, 고모부 최재철님 그리고 작은고모님 평생 갚아도 다 못다 할 그 은혜를 이 논문으로 조금 대신하고자 합니다.

가족과 같이 보내야 할 많은 휴일들을 혼자 보내면서도 불평한마디 않고, 내가 힘들고 지칠 때 평안과 위안을 주고 세 아이를 키우면서도 싫은 내색 없이 가정의 행복을 위해 헌신하는 사랑하는 나의 아내 신정희에게 이 모든 영광과 기쁨을 바칩니다. 어느새 아가씨처럼 불쑥 자라버린 우리집 보배 세영이와 귀엽고 예쁜 세침때기 세린이 그리고 아빠가 바쁘다는 핑계로 잘 놀아주지도 못했는데 씩씩하고 훌륭하게 자라준 막내 연준이와 함께 이 기쁨을 같이 합니다.