J. Fd Hyg. Safety
Vol. 23, No. 4, pp. 324~329 (2008)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

액체크로마토그래피를 이용한 광어 및 계란 중 퀴놀론계의 동시분석법 개발

이상희 · 심유신 · 김현주 · 최윤희 · 신동빈*
한국식품연구원, 식품분석센터

Simultaneous Determination of Quinolones in Flatfish and Egg Using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection

Sang-hee Lee, Yousin Shim, Hyunju Kim, Yoon-hee Choi, and Dong-bin Shin*
Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Bundang, Seongnam, Gyeonggi, Korea
(Received November 24, 2008/Revised December 9, 2008/Accepted December 17, 2008)

ABSTRACT – An analytical method for the simultaneous determination of nine quinolones (QNs) namely, marbofloxacin, norfloxacin(IS), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, oxolinic acid, and flumequine in flatfish and egg was developed and validated using liquid chromatography with fluorescence detection (LC-FD). The samples were extracted using a traditional liquid-liquid extraction process; deproteinization was accomplished by the addition of trichloroacetic acid and acetonitrile (ACN), and defatting was performed with hexane. Chromatographic separation was achieved on a reverse phase C8 column with gradient elution using a mobile phase of 200 mM ammonium acetate buffer (pH 4.5) and ACN. The proposed method was validated according to the CODEX guideline. Mean recoveries of QNs from flatfish and egg were 89.6-106.5 % with relative standard deviations (RSDs) below 15 % at three different concentrations of 50, 100 and 500 μg/kg. Linearity was obtained with a correlation coefficient (r^2) of 0.9989-1.0000. The LOD for the investigated QNs was 1-16 μg/kg depending on flatfish and egg. The present method can be applied simultaneously to determine QNs in muscle of flatfish and egg.

Keywords: Quinolones; Flatfish; Egg; HPLC-FD; Validation

퀴놀론(QNs)계는 합성항균제로, 4-quinolone을 모핵으로 파생된 약제로 이종방향족(heteraromatic), 이중환 (bicyclic)을 가지고 있다. 이들은 DNA gyrase의 활성을 감소시켜서 DNA 합성 자체를 막아 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 그람음성균과 그람양성균 모두에 대해 탁월한 효과를 가지는 것으로 보고되고 있어 사람뿐 아니라 가축 및 수산동물의 치료 목적으로 널리 사용되고 있다[1]. 그러나, 축.수산의 경영형태가 대규모화됨에 따라, 생산성의 증가와 더불어 세균성 질병의 방지 및 치료를 위해서 축수산용 항생물질의 사용이 불가피한 측면이 있으나, 이들 약제의 오.남용으로 인하여 세균에 있어서 그 내성을 증가시킴으로써 식품 중에 항생물질의 잔류로 인한 인체에 미치는 영향이 심각하게 문제시 되고 있다[2]. 그리하여, QNs에 대해 CODEX, 미국, 유럽 등 세계각국에서는 가축 및 수산물에 대해 잔류허용기준(maximum residue limit; MRL)[3]을 설정하여 규제를 강화하고 있는 실정이며, 물론 우리나라에서도 QNs의 일부 항목에 대한 사용을 규제하고 있다. 그리하여, 이러한 항생물질의 오,남용으로 식품의 안전성 문제가 우려됨에 따라, 이에 대한 체계적인 관리를 위해 식품 중 잔류 항생물질을 식품 종류에 따라 정확히 분석할 수 있는 분석법확립에 대한 정밀성, 정확성, 재현성에 대한 정확한 검증이 필요한 실정이다[4-5]. 따라서, 최근 항생물질에 대한 새로운 분석전처리 기술 및 검출분석기술의 발달로 항생물질 계열별에 따른 다성분 동시분석법의 개발이 활발히 진행되고 있으나[4], 국내의 경우에는 이에 대한 연구가 매우 미약한 실정이다.

국내외의 현재까지 보고되어 있는, 식품 중 퀴놀론계 항생물질의 잔류시험법으로는, 미생물분석법과 면역분석법[6-8] 등이 있다. 그러나, 이는 각 약물들에 대한 특이성과 민감도가 부족하여, 미량의 정량분석에는 어려운 단점이 있다. 한편, 정량법으로는 시료의 전처리가 비교적 용이하고 재현성이 높으며, 정밀한 분석결과를 얻을 수 있는 high performance liquid chromatography (HPLC)[9-13]를 이용한 분석법이 가장 많이 사용되고 있다. 또한, 시료 전처리법

*Correspondence to: Dong-bin Shin, Food Analysis Center, Korea Food Research Institute, Bundang, Seongnam, Gyeonggi, Korea.
Tel: 82-31-780-9126, Fax: 82-31-780-9280
E-mail: shindb@kfri.re.kr

으로는 유기용매로 추출하고 카트리지를 이용해 정제하는 고체상추출법[14-15]과, 분석 대상물의 용해도 차이를 이용하여 유기 용매층으로 이행시킨 후 지방층을 제거하는 액상추출법[9,11]이 보고되고 있다.

따라서 본 연구에서는, 국내외에서 보고된 퀴놀론계 항생물질인 marbofloxacin, norfloxacin(IS), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, sarafloxacin, difloxacin, oxolinic acid, 그리고 flumequine의 9종을 동시에 분석할 수 있는 분석법의 문헌고찰을 토대로, 축.수산 식품에 잔류하는 QNs의 분석법을 개발하였고, CODEX 기준에 의한 분석법 검증을 실시하여 분석법의 신뢰성을 제고함으로써, HPLC를 이용한 최적의 분석법을 확립하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 표준품

광어 및 계란 시료는 분당소재의 대형유통마트에서 구입하였으며, 분석 전까지 냉동보관 하였다. 본 실험에 사용된 퀴놀론계(QNs) 표준품, norfloxacin (NOR; 내부표준물질), danofloxacin (DAN), ciprofloxacin (CIP), difloxacin (DIF), enrofloxacin (ENR), oxolinic acid (OXO) 그리고 flumequine (FLU)은 모두 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하여 사용하였다. Marbofloxacin (MAR)과sarafloxacin (SAR)은 Abbott (Barcelona, Spain) 제품을 구입하여 사용하였다. 아세토니트릴과 헥산(J.T.Baker, Phillipsburg, NJ, USA)은 HPLC용을 사용하였으며, 나머지 시약 등은 특급 시약을 사용하였다.

표준용액 조제

QNs 표준품 9성분을 각각 10 mg을 정밀히 달아 아세토니트릴을 소량 가하여 녹인 후, 100 ml 갈색 용량플라스크에 0.2 M ammonium acetate buffer (pH 4.5)을 이용하여 100 mg/kg의 농도로 조제한 것을 표준원액으로 하여, **4 ℃**에서 냉장보관하였다. 표준용액은 매 실험 시마다 표준원액을 이동상 A로 희석하여 10-500 ng/mL의 농도가 되게 하여 사용하였다.

HPLC 조건의 최적화

본 실험에서 QNs의 분석을 위해 Waters HPLC에 **2475** 형광검출기가 장착된 기기를 사용하였으며, 분석 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm×4.6 mm id, 5 μm)를, 그리고 주입량은 10 μl로 하였다. 이동상으로는 (A) 200 mM ammonium acetate buffer(pH 4.5)와, (B) ACN을 0.2 μm membrane filter로 여과하고, 초음파 세척기로 탈기하여 사용하였고, 기울기 용리조건 및 형광검출기의 여기파장과 측정파장은 다음과 같이 프로그램화하여 분석하였다 (Table 1).

시료 전처리 과정

완전히 균질화된 광어 근육과 계란 시료 각각, 1 g을 50 ml 원심분리용 튜브에 취하고, 내부표준물질(NOR, 100 ng/ml) 1 ml과 1 M trichloroacetic acid 1 ml을 가하여 약 10분간 혼합한 후, sodium sulfate 2 g을 가하여 다시 15초간 혼합하였다. 혼합물에 ACN 8 ml을 가하고, 5분간 혼합한 후, 20분간 3000 rpm로 원심분리하였다. 상층액은 다른 튜브에 옮겨 담고, 남은 잔류물에 ACN 5 ml을 가하고, 5분간 혼합한 후, 20분간 3000 rpm로 원심분리하여 상층액을 합하였다. 합해진 상층액에 10 ml의 n-hexane을 첨가하여 혼합하고, 20분간 3000 rpm로 원심분리하여 하층액을 취해 50 ℃에서 질소하에 건고시킨다. 그 후, 잔사물에 0.5 ml 이동상 A와 0.5 ml 이동상 B를 가하여 용해시킨 후, 14000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 0.45 μm PVDF syringe filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

분석법의 검증

QNs 10-500 μg/kg의 농도가 되도록 시료에 각각 spiked하고, 시료 전처리 과정에 따라 추출한 후, HPLC-FD에 주입하여 얻은 농도별 피크 면적의 비를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 각 검량선의 상관성(coefficient of correlation, r^2)을 구하였다.

그리고, QNs 분석법의 정밀도 및 정확도(coefficient of variation, C.V., %)를 평가하기 위하여, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내 정밀도와 정확도를 측정하였고, 3일

Table 1. Analytical conditions of quinolones for flatfish and egg

Column	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm)		
Detector	Excitation and emission-MAR 297 nm, 515 nm; NOR, CIP, DAN, ENR, SAR, DIF 280 nm, 450 nm; OXO 260 nm, 365 nm; FLU 325, 365 nm		
Mobile phase	A: 200 mM ammonium acetate buffer(pH 4.5), B: ACN		
		Mobile phase A (%)	Mobile phase B (%)
	0-8min	90	10
	11-13min	83	17
	17-22min	55	45
	23-25min	10	90
	26-32min	90	10

간 동일실험을 반복 수행하여 일간 정밀도를 구하였다.

검출한계(LOD)는 3.3σ/S (y-intercepts of regression analysis (σ), the slope (S) of a calibration curve)으로, 정량한계(LOQ)는 10σ/S의 수식에 의해 산출하였다.

결과 및 고찰

식품 중 QNs의 분석법 개발 및 검증

LC-FD분석

식품 중에 잔류하는 QNs의 HPLC분석방법 중 컬럼, 시료전처리 조건, 이동상의 조성, 검출파장 등을 변경하여, QNs의 분석 감도 및 간섭물질로부터의 분리능 등을 최적화하는 분석법을 개발하였다. HPLC컬럼으로 가장 많이 사용되는 C18컬럼과 C8컬럼으로 비교하여 본 결과, 본 연구에서는 분리 시간이 짧으며, 좋은 분리능을 가진 Zorbax Eclipse XDB-C8 컬럼을 선정하여 사용하였다. 또한, QNs 분석 시 여러 종류의 이동상 용매가 사용되고 있으나, 대부분의 경우 크로마토그램상의 peak tailing이 심각한 문제로 대두되고 있다. 이러한 peak tailing은 QNs이 분자구조상 산성과 염기성의 작용기를 모두 가지고 있으므로, 컬럼의 고정상에 있는 silanols과 결합하여 분석 시 발생하는 것으로 알려져 있다[16]. 이는 HPLC분석 시 이동상의 pH가 분리에 영향을 주기 때문인 것으로, 본 연구에서는 이동상을 산성(citrate buffer-, formic acid-, 그리고 ammonium acetate 수용액)으로 조절하고 citrate buffer는 10-100 mM까지, formic acid는 0.02 %-0.1 %까지 그리고 ammonium acetate 수용액은 20-100 mM까지 농도를 증가시켜 예비실험하였으나, 농도가 낮을수록chromatogram상의 심각한peak tailing을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 실험에서는 여러 가지 산성 이동상의 농도를 증가시킴으로써 실험한 결과, 200 mM ammonium acetate와 ACN이 가장 이상적으로, chromatogram상의 peak tailing의 문제점을 해결할 수 있었다. 그 결과, 9종의 QNs 분석대상물질과 시료 내 방해물질을 분리시키고 분석대상물질의 감도를 증대시킨 최적화된 분석 크로마토그램은 Fig. 1-2와 같다.

QNs의 분석을 위한 기존 추출방법의 문제점 및 개선

QNs 항생물질의 동시분석을 위하여, 본 연구에서는 기존의 보고되어진 방법[10-11,13-14,17] 을 토대로 광어 및 계란에

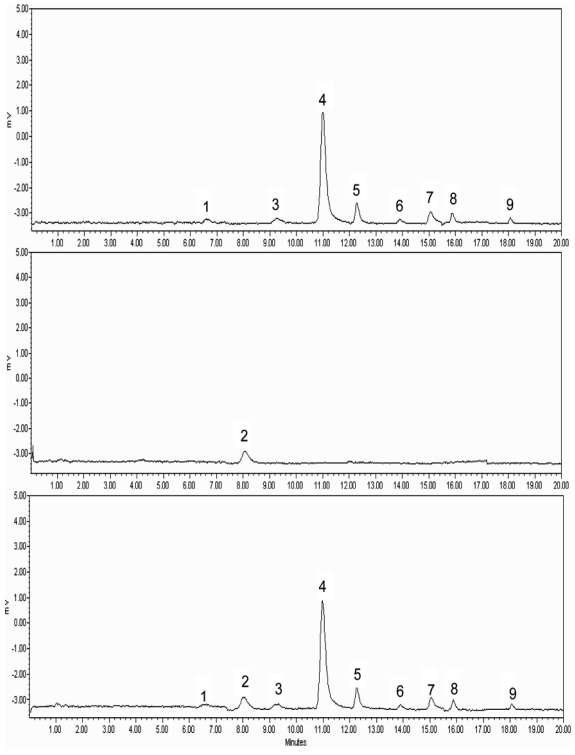

Fig. 1. HPLC chromatogram of (A) a standard mixture of the selected QNs, (B) an unspiked flatfish and (C) a spiked flatfish at 100 μg/kg of QNs. Peaks identifications: (1) marbofloxacin, (2) norfloxacin (IS); (3) ciprofloxacin, (4) danofloxacin, (5) enrofloxacin, (6) sarafloxacin, (7) difloxacin, (8) oxolinic acid, (9) flumequine.

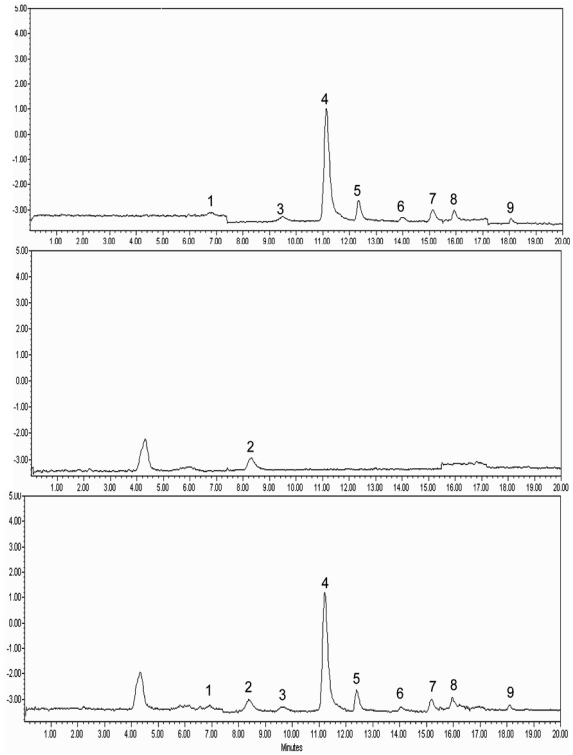

Fig. 2. HPLC chromatogram of (A) a standard mixture of the selected QNs, (B) an unspiked egg and (C) a spiked egg at 100 μg/kg of QNs. Peaks identifications: (1) marbofloxacin, (2) norfloxacin (IS); (3) ciprofloxacin, (4) danofloxacin, (5) enrofloxacin, (6) sarafloxacin, (7) difloxacin, (8) oxolinic acid, (9) flumequine.

적용하여 좀 더 나은 방법을 찾고자 전처리 과정을 변형하였다. QNs은 분자구조상 산성과 염기성의 작용기를 모두 가지고 있으므로 기존의 논문에서는 Gigosos[10]와 Christodoulou[11]에서 대부분 수산물 및 계란내의 QNs을 HPO_3, TFA, acetic acid, HCl, TCA, NaOH 나 phosphate buffer로 추출한 후, OASIS HLB나 C18 cartridge로 정제하는 고체상추출법을 사용하였으나, 본 실험과 비교하여 회수율이 조금 낮거나 비슷한 결과를 나타냈다. 하지만, 이는 전처리 시간이 길고, 고가의 카트리지를 사용하여야 하는 문제점이 있어, 이러한 단점을 보완하기 위하여 본 연구에서는, Zeng[13]이나 Karbiwnyk[14] 및 Roudaut[17]등이 제시한 추출과정이 빠르고, 쉬우며, 동시에 많은 전처리를 할 수 있는 액상추출법을 선택하였다. 따라서, 본 실험에서는 산성 수용액으로 추출 및 제단백하고, ACN용매로 액-액 추출 후, hexane으로 지방을 제거하는 액상추출법을 이용하여, 기존의 논문[13-14,17]보다 회수율이 조금 더 높은 결과로, 이는 CODEX[4-5] 에서 설정한 회수율의 80-110 % 에 적합한 매우 만족스러운 실험결과를 얻을 수 있었다.

Method validation의 결과

특이성

분석 조건의 특이성을 위해, blank시료에 100 μg/kg의 농도로 광어 및 계란 시료에 각각 spike하여 본 연구의 시료 전처리법으로 검체를 처리하여 LC/FD로 분석한 결과의 크로마토그램을 Fig. 1-2에 나타내었다. Fig. 1-2 에서와 같이, QNs 9종이 들어있지 않은 무항생제 광어 및 계란(바탕시료)과 첨가시료 사이에 어떠한 방해 피크없이 표준용액과 동일한 분리도를 확인할 수 있었다.

검량곡선, 검출한계 및 정량한계

QNs 표준물질을 무항생제 광어 및 계란(바탕시료)에 첨가하여 전처리 과정을 거쳐 얻어진 자료를 토대로 검량곡선을 작성하고, 검량식을 구하였다. 검량곡선은 QNs 광어 및 계란의 경우, 10~500 μg/kg 농도범위에서, 대부분의 상관계수 r^2는 0.9989 이상으로 좋은 직선성을 보였으며, CODEX[4-5] 에서 권장하는 $r^2 \geq 0.95$와 비교하여도 매우 만족할 만한 수준의 결과를 얻을 수 있었다 (Table 2).

QNs 표준용액을 바탕시료(광어 및 계란)에 spike시켜 전처리 후, 검출한계(LOD)는 3.3σ/S (y-intercepts of regression analysis (σ), the slope (S) of a calibration curve)의 수식에 의해 산출하고, 정량한계(LOQ)는 10σ/S의 수식에 의해 산출하였다. QNs에 대해 광어의 LOD는 1-11 μg/kg, 계란은 1-16 μg/kg 이었으며, LOQ는 광어의 경우 3-32 μg/kg, 계란은 4-47 μg/kg을 나타내었다. 이는 다른 연구자들이 보고한 LOD 및 LOQ의 결과보다 조금 낮거나 유사한 결과[9-10, 13]를 나타낸다.

재현성 및 회수율

또한, 광어 및 계란에서 50, 100, 그리고 500 μg/kg에 해당하는 농도에서, 위의 방법에 따라 전처리 후, 하루에 실험을 3회 반복 시행하여 일내(within-day) 정밀도와 정확

Table 2. Linearity and sensitivity data of the developed method for the determination of QNs in spiked food samples

Analytes	Concentration range (μg/kg)	r^2	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)
Flatfish				
MAR	30-500	0.9993	11	32
CIP	10-500	0.9996	3	10
DAN	10-500	0.9999	2	4
ENR	10-500	0.9996	4	12
SAR	10-500	0.9992	4	12
DIF	10-500	0.9995	1	3
OXO	15-500	1.0000	3	10
FLU	15-500	0.9998	5	14
Egg				
MAR	50-500	0.9993	16	47
CIP	10-500	0.9996	2	5
DAN	10-500	0.9990	1	4
ENR	10-500	0.9992	5	16
SAR	30-500	0.9999	12	35
DIF	15-500	0.9998	7	22
OXO	30-500	0.9989	8	23
FLU	30-500	0.9993	5	15

도를 구하였고, 3일간 실험을 반복 수행하여 일간(day-to-day) 정밀도를 구하였다 (Table 3). 본 실험 방법의 정확도와 정밀도는 CV%값이 광어의 경우 각각 0.6-10.5 %, 1.0-11.7 %이었으며, 계란의 경우 각각 0.2-15.0 %, 0.5-9.2 %로 CODEX[4-5] 에서 설정한 정확도와 정밀도의 15 %이내에 해당하므로 매우 만족할 결과라고 할 수 있다.

또한, QNs 이 잔류하지 않은 광어 및 계란시료에 농도가 각각 50, 100, 그리고 500 μg/kg이 되게 하여 각 시료에 대한 회수율을 검토한 결과, 광어의 경우 89.6-105.3 % 및 계란의 경우 96.3-106.5 %로 양호한 회수율을 보이는 결과로, 이는 CODEX[4-5] 에서 설정한 회수율의 80-110 %에 적합한 매우 만족스러운 실험결과를 얻을 수 있었다.

따라서, 본 방법은 광어 및 계란 중에 QNs를 분석하기에 효과적인 시료 전처리 및 기기분석법으로 생각된다.

요 약

본 논문에서는 식품 중 퀴놀론계(QNs) 합성항균제 (marbofloxacin, norfloxacin, danofloxacin, ciprofloxacin, enrofloxacin, difloxacin, sarafloxacin, oxolinic acid 그리고 flumequine) 9종을 분석하기 위하여, 액-액 추출 과정을 거쳐서 형광검출기가 장착된 액체크로마토그래피를 이용하여 QNs를 효율적으로 동시분석하는 방법을 확립하였다. 컬럼은 Zorbax Eclipse XDB-C8(150 mm×4.6 mm, 5 μm), 이동상 용매는 200 mM ammonium acetate buffer (pH 4.5)와 ACN로 기울기 용리를 사용하였으며, 유속은 1.5 ml/min, 그리고, 주입량은 10 μl로 설정하여 분석하였다. 확립된 분석조건으로, 표준검정 곡선은 10-500 μg/kg의 농도범위에서 상관계수가 0.9989 이상의 양호한 직선성을 나타

Table 3. Intra-day (n=3) and inter-day (over a period of three consecutive days) precision and accuracy data for the determination of QNs in spiked food samples

Analytes	Added (μg/kg)	Flatfish			Egg		
		Recovery (%)	Intra-day (CV%)	Inter-day (CV%)	Recovery (%)	Intra-day (CV%)	Inter-day (CV%)
MAR	50	102.8	6.2	11.7	98.2	15.0	9.2
	100	105.3	2.1	5.7	102.3	10.3	6.8
	500	100.1	1.1	1.8	100.4	1.6	1.6
CIP	50	89.6	6.4	10.9	100.6	6.7	7.1
	100	102.8	6.6	7.0	98.6	5.3	6.8
	500	100.0	1.6	1.6	99.8	1.4	1.0
DAN	50	95.2	3.7	6.7	100.0	9.3	8.5
	100	100.4	5.9	5.1	99.0	4.4	4.1
	500	99.8	0.8	1.2	99.9	0.3	0.5
ENR	50	98.1	10.5	11.1	99.6	5.0	6.3
	100	100.0	8.1	5.6	98.6	2.6	2.7
	500	99.7	0.6	1.0	99.8	0.4	0.5
SAR	50	99.7	7.2	9.8	103.2	10.2	8.5
	100	103.3	7.2	6.6	97.1	3.1	4.7
	500	100.4	1.9	1.6	99.9	1.7	1.4
DIF	50	100.1	3.8	8.0	101.4	11.4	7.2
	100	98.8	7.4	6.9	96.3	8.6	4.9
	500	99.8	1.4	1.2	99.8	0.6	0.5
OXO	50	98.8	6.7	9.6	106.5	2.8	2.7
	100	98.3	5.0	5.1	97.1	2.3	3.6
	500	99.6	1.6	1.2	100.3	0.4	0.7
FLU	50	97.8	6.5	9.1	98.4	7.2	6.9
	100	104.1	9.1	4.7	97.4	5.7	3.9
	500	100.7	1.9	1.5	98.9	0.2	1.4

내었으며, 회수율은 50, 100 그리고 500 μg/kg의 농도에서 89.6-106.5 %로, 향상된 추출효율을 나타내었다. 검출한계는 1-16 μg/kg이었고, 정량한계는 3-47 μg/kg이었으며, 일내(intra-day)와 일간(inter-day) 정밀도(CV%)는 0.2-15.0 %, 0.5-11.7 %이었다. 따라서, 확립된 분석방법은 광어 및 계란 중의 QNs을 효과적으로 분석하는데 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Drlica, K., and Zhao, X. : DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 377-92 (1997).
2. Heo, G. J., Shin, K.S., and Lee, M. H. : Diseases of aquaculture animals and prevention of drug residues. *Kor. J. Food. Hygiene*. **7**, 7-19 (1992).
3. Anonymous 2004. Consolidated version of the Annexes I to IV of Council Regulation no. 2377/90. Updated 22/12/2004. Available: http://pharmacos.eudra.org/F2/mrlconspdef. Accessed May 29 (2006).
4. Codex guidelines for the establishment of a regulatory programme for control of veterinary drug residues in foods (CAC/GL 16) (1993).
5. Validation guidelines, Codex committee on residues of veterinary drugs in foods, 11th session (1998).
6. Okerman, L. Noppe, H. Cornet, V., and De Zutter, L. : Microbiological detection of 10 quinolone antibiotic residues and its application to artificially contaminated poultry samples. *Food. Addit. Contam*. **24**, 252-7 (2007).
7. Cho, H. J., Abd El-Aty, A. M., Goudah, A., Sung, G. M., Seo, D. C., Kim, J. S., Shim, J. H., Jeong, J. Y., Lee, S. H., and Shin, H. C. : Monitoring of fluoroquinolone residual levels in chicken eggs by microbiological assay and confirmation by liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr*. **22**, 92-99 (2008).
8. Watanabe, H., Satake, A., Kido, Y., and Tsuji, A. : Monoclonal-based enzyme-linked immunosorbent assay and immunochromatographic assay for enrofloxacin in biological matrices. *Analyst*. **127**, 98-103 (2002)
9. Hassouan, M. K., Ballesteros, O., Taoufiki, J., Vilchez, J. L., Cabrera-Aguilera, M., and Navalon, A. : Meltiresidue determination of quinolones in eggs of laying hens by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **852**, 625-630 (2007)
10. Zeng, Z., Dong, A., Yang, G., Chen, Z., and Huang, X. : Simultaneous determination of nine fluoroquinolones in egg white and egg yolk by liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **821**, 202-9 (2005)
11. Karbiwnyk, C. M., Carr, L. E., Turnipseed, S. B., Andersen, W. C., and Miller, K. E. : Determination of quinolone residues in shrimp using liquid chromatography with fluorescence detection and residue confirmation by mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*. **596**, 257-63 (2007)
12. Schneider, M. J., Darwish, A. M., and Freeman, D. W. : Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta*. **586**, 269-74 (2007)
13. Roudaut, B., and Yorke, J, C. : High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafloxacin in fish. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **780**, 481-5 (2002).
14. Christodoulou, E. A., Samanidou, V. F., and Papadoyannis, I. N. : Validation of an HPLC-UV method according to the European Union Decision 2002/657/EC for the simultaneous determination of 10 quinolones in chicken muscle and egg yolk. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. **859**, 246-55 (2007) .
15. Samanidou, V., Evaggelopoulou, E., Trötzmüller, M., Guo, X., and Lankmayr, E. : Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. **1203**, 115-23 (2008).
16. Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V. : Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography effect of p H and evaluation of ionization constant. *J. Chromatogr. A*. **823**, 411-422 (1998).
17. Gigosos, P. G., Revesado, P. R., Cadahía, O., Fente, C. A., Vazquez, B. I., Franco, C. M., and Cepeda, A. : Determination of quinolones in animal tissues and eggs by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection. *J Chromatogr A*. **871**, 31-6 (2000).