Kor. J. Food Hygiene 8 (3), 147-150(1993)

보리새우에 잔류하는 Oxolinic Acid의 HPLC를 이용한 검출법

이문한 · 임재영 · 정순관 · 손성완* · 박종명*

서울대학교 수의과대학 *농촌진흥청 가축위생연구소

Determination of Oxolinic Acid Residues in *Acetes japonicus* by HPLC

Mun-Han Lee, Jae-Young Lim, Soon-Kwan Jung Seong-Wan Son* and Jong-Myung Park*

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

**Veterinary Research Institute, Rural Development Administration*

ABSTRACT—A novel rapid and sensitive method to determine residual oxolinic acid in *Acetes japonicus* was developed. The residual oxolinic acid was extracted with ethylacetate and diluted oxalic acid, and interfering substances were removed by hexane. Fifty ppb residual concentration in the extract could be quantitated by UV-HPLC and the recovery rates were 79~91% according to the fortified amounts.

Keywords □ Tissue residue, oxolinic acid, *Acetes japonicus*

국외는 물론 국내에서도 어류양식업이 급속히 성장함에 따라, 각종 질병을 예방하거나 치료하기 위하여 다양한 종류의 항균성 물질이 사용되고 있어 어체에 잔류하는 약물에 대한 규제의 필요성이 요구되고 있다. 그 중 oxolinic acid는 nalidixic acid 유도체로서 국내 및 국외에서도 양어양식에 널리 쓰이는 강력한 항균성 물질이다. 특히 *Yersinia*, *Aeromonas*, *Pseudomonas* 그리고 *Vibrio* 등과 같은 균속에 의한 질병의 예방 및 치료에 널리 쓰이고 있다. 이는 하루에 어체중 kg당 12 mg 수준으로 사료에 첨가하여 투여하는데 이 약제에 대한 안전 수준은 아직 잘 밝혀져 있지 않으나, 중추신경에 독성이 있어 운동신경 활성(motor activity)을 증가시키고, 감응성(irritability)을 보이는 것으로 알려져 있다.[1] 국내에서도 뱀장어의 지느러미병, 에드와드병과 적점병, 방어의 유결절증, 잉어의 에로모나스증, 무지개송어의 절창병과 비브리오병, 은어의 비브리오병 등에 널리 쓰이고 있으나 투여 용량과 약제 제조업체에 따라서 뱀장어 18~20일, 방어 20일, 잉어 18~20일, 송어 21일, 은어 7~14일의 안전 휴약 기간만 제시되어 있다.

Oxolinic acid를 검출하는 방법은 몇가지 알려져 있는데, 생물학적 검사법(bioassay)[2,3] 형광분석법(fluorometry)[3] 그리고 HPLC법[4-10] 등이 있으나 생물학적 검사법과 형광광도법은 HPLC법에 비하여 검출 감도가 매우 낮으며 또한 활성형 대사물(active metabolite)에 대하여 비특이적으로 반응하는 것으로 알려져 있다. 따라서 최근에는 LC를 이용한 oxolinic acid 분석법이 많이 보고되어 왔으나 그 검출한도가 200~500 ppb로서 매우 낮으며, 추출방법이 매우 복잡하여 일시에 다량의 시료를 처리하는데는 어려움이 많은 실정이다.

따라서 본 실험에서는 HPLC을 이용하여 보리새우에 잔류하는 oxolinic acid를 검출할 수 있는 간편, 정확한 방법을 고안하여 보고하는 바이다.

Received for publication 7 July, 1993.
Reprint request: Dr. M. H. Lee, 103 Seodundong Suwon, 441-744.

Take sample 2.0 g, 12 ml dry ethylacetate, and 2.0 g sodium sulfate in centrifugal tube
↓
Homogenize with polytron (if necessary, fortify STD)
↓
Centrifuge at 1500 rpm for 10 min.
↓
Evaporate spt. at 50~55℃ under rotatory evaporatoar
↓
Redissolve the driness with 2 ml 0.01 M oxalic acid, pH 3.0 and 2 ml hexane
↓
Transfer the aqueous layer
↓
Filterate with Milipore filter
↓
Collect the sample extract

Fig. 1. Procedure of sample extraction.

재료 및 방법

용액의 제조

1. Dried ethylacetate－1 L의 ethylacetate에 50 g의 sodium sulfate을 첨가하여 수분을 제거한 후 여과하여 사용하였다.

2. 0.01 M oxalic acid 용액－1.26 g의 oxalic acid dihydrate(Kanto)을 1 L의 volumetric flask을 이용하여 증류수로 희석하였다.

3. 0.01 M oxalic acid, pH 3.0 용액－3 N NaOH용액을 사용하여 0.01 M oxalic acid 용액을 pH 3.0으로 조절하였다.

4. Oxolinic acid 표준 용액

100 μg/ml oxolinic acid 용액－Oxolinic acid(Sigma) 0.01 g을 100 ml의 volumetric flask에 정확히 취한 후 dimethyl sulfoxide 10 ml을 첨가하여 완전히 용해시켜 acetonitrile로 100 ml되게 희석하였다.

10 μg/ml oxolinic acid 용액－100 μg/ml 표준용액 10 ml을 정확히 취한 후 acetonitrile로 100 ml 되게 희석하여 사용하였다.

추출 방법－2 g의 보리새우에 12 ml의 dried ethylacetate와 2.0 g의 sodium sulfate를 50 ml의 원심관에 넣고 polytron으로 균질화 시켰다. 회수율을 측정하기 위한 실험에서는 이 시기에 표준용액을 첨가하였다. 균질화 과정을 수행한 후 polytron은 증류수로 1분간 세척하고 다시 ethyl acetate로서 1분간 세척한 다음 재사용하였다. 균질화시킨 시료는 1500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액만을 취하여 50~55℃ 하에서 rotatory evaporator를 사용하여 증발건조시켰다. 여기에 0.01 M oxalic acid (pH 3.0) 2 ml과 hexane 2 ml을 가하여 재용해시킨 후 수액층만 Milipore filter를 사용하여 여과시킨 다음 냉장 보관하면서 정량분석에 사용하였다(Fig. 1).

HPLC 조건－Oxolinic acid의 정량시의 HPLC 분석조건은 다음과 같다.

Waters model 510 pump, Waters model 486 tunable absorbance detector, Waters model 746 data mode, μBondapak C_{18} (3.9×300 mm) column.

Mobile phase: acetonitrile-methanol-0.01 M oxalic acid (3 : 1 : 6), flow rate: 2.0 ml/min, chart speed: 0.5 cm/min, AUFS: 0.01, peak threshold: 300, detector wavelength: 270 nm

결과 및 고찰

Oxolinic acid(5-ethyl-5,8-dihydro-8-oxo-1,3-dioxolo[4,5-g]quinoline-7-carboxylic acid)는 양어양식에 흔히 사용되는 항균성 약제이나(Fig. 2), 국내에서는 어류에 대한 잔류허용 기준과 안전휴약기간이 아직 설정되어 있지 않으며 공정 잔류검사법도 아직 확립되어 있지 않은 실정이다. 뿐만 아니라 양식 어류에 사용되고 있는 항균성 약제의 잔류와 그 잔류검사 방법에 대한 연구도 거의 없는 실정이다.

Oxolinic acid을 검출하는데는 자외선 검출기[4-11]를 이용한 HPLC법이 널리 사용되고 있으며, 다양한

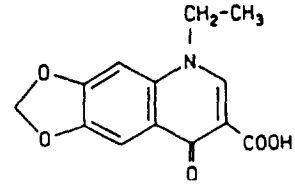

Fig. 2. Structure of oxolinic acid.

Table 1. Calibration curve for oxolinic acid

Concn, ng/ml	N	Peak area	Concn, ng/ml	N	Peak area
50	3	111.6	300	3	701.7
100	3	229.0	400	3	953.7
200	3	449.3	500	3	1298.3
R			0.997		
Slop (standard error)			25.80 (1.01		
Y-intercept (standard error)			−42.58 (30.51)		
X-intercept (standard error)			1.65 (1.13)		

종류의 column과 전개용매가 소개되어 있다. Oxolinic acid의 검출파장은 전개용매의 종류에 따라서 다양한데 Kasuga 등[5]은 330 nm, Nose 등[7]은 280 nm, Ikai 등[11]은 295 nm에서 측정하였으나 본 실험에서는 acetonitrile/methanol/oxalic acid 혼합용매를 사용할 때 270 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 것으로 나타났다.

본 실험에서 C_{18} column과 위에서 제시한 HPLC 분석조건하에서 oxolinic acid 표준액 50～500 ng/ml에 대하여 표준곡선을 작성하였던 바 Table 1에서와 같은 결과를 얻었다. 대체로 이 범위내에서는 농도에 비례하여 peak 높이와 면적이 증가하는 것으로 나타났다.

Ikai 등은[11] minicolumn을 사용하여 oxolinic acid를 추출하는 간단한 전처리 과정을 소개하였으나 본실험에서는 Ikai 등[11]과 Larocque 등[12]이 제시한 추출 방법을 변형하여 간편한 전처리 과정을 개발하였다. 즉, 시료를 ethylacetate로 1차 추출한 다음 증발건조시키고 여기에 묽은 oxalic acid와 hexane을 가하여 방해물질을 제거하면서 수액층에 재분배시키는 방법을 고안하였다.

시료 전처리 방법과 대상 시료의 종류에 따라서 oxolinic acid의 회수율도 다양한 것으로 보고되어 있는데, Nose 등[7]에 의하면 뱀장어에서 75.4～85.4%, 무지개송어에서는 81.9～90.5%를 나타내었다고 보고하였으며 Ikai 등[11]은 여러 물고기에서 77.1～95.5%, Larocque 등[12]은 연어에서 71～83%를 나타내었다고 보고하였다.

본 실험에서 oxolinic acid가 검출되지 않은 것으로 밝혀진 보리새우 시료에 일정량의 oxolinic acid을 첨가하여 각각의 회수율을 측정하였던 바 Table 2에서와 같이 회수율은 79.1～91.4%를 나타내어 비교적 높은 회수율을 보였다.

Table 2. Recovery rates of oxolinic acid

(Mean± S.E.)

Added, ppb	N	Recovery (%)
50	3	91.40± 2.26
100	3	81.66± 0.15
200	3	80.49± 1.06
400	3	79.17± 0.49
500	3	84.50± 0.52

Nose 등[7]은 어류에 있어서 oxolinic acid의 검출한계는 500 ppb로서 감도가 매우 낮다고 하였으며 Horii 등 [8]은 200 ppb인 것으로 보고하였으나 본 실험에서의 검출한계(LOQ, detect limit of quantitation)는 50 ppb로서 Ikai 등[11]의 실험결과와 비슷한 검출한계량을 나타내었다(Fig. 3). 그러나 Larocque 등[12]은 형광검출기를 사용하였을 때 10 ppb까지 검출 가능하다고 보고하였다. 그러나 본 연구의 예비실험에서 동일한 방법으로 형광검출기를 사용하였을 때 baseline이 불안정하여 재현성 있는 정량 결과를

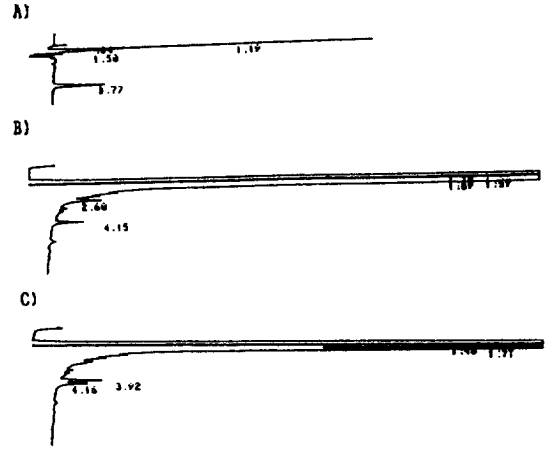

Fig. 3. Chromatogram of oxolinic acid.
A) Oxolinic acid standard (10 ppb)
B) Extract of blank sample
C) Extract of fortified sample (100 ppb)
Conditions: C_{18} column; mobile phase, acetonitrile/methanol/oxalic acid (3/1/6); detector, 270 nm; injection volume, 100 μl.

얻을 수 없었다.

이 연구에서 개발한 추출법을 대만에서 수입한 보리새우에 적용하였던 바 oxolinic acid는 표준액의 경우 retention time 3.77분에서, 그리고 시료의 경우에는 3.92분에서 peak가 보였으며(Fig. 3의 A와 C), oxolinic acid 부근에 4.15분대의 방해물질 peak가 있기는 하였지만(Fig. 3의 B와 C) 정량에는 어려움이 없었으며 특히 비교적 높은 회수율과 검출감도를 보였고 재현성도 뛰어나 공정분석법으로 활용 가능할 것으로 판단된다. 앞으로 oxolinic acid를 사용하는 다른 종류의 양식 어류에도 적용 가능한지 여부에 대하여 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

국문요약

Oxolinic acid는 양식어류에 흔히 쓰이고 있는 항균성물질이나 국내에서는 잔류허용 기준과 공정분석법이 설정되어 있지 않은 실정이다. 해외의 경우 이 물질을 분석할 수 있는 여러 방법이 고안되어 소개되어 있으나 검출감도가 낮거나 분석 방법이 복잡하여 단시간내에 다량의 시료를 처리하는데는 어려움이 있다. 본 연구에서는 보리새우 중에 잔류하는 oxolinic acid를 ethylacetate로 용출한 다음 이를 증발시키고 여기에 묽은 oxalic acid와 hexane을 가하여 방해물질을 제거하면서 재추출하여 시료를 정제하였다. 이 시료를 HPLC의 자외선 검출기로 정량하였던 바 회수율은 79~91%, 검출한계는 50 ppb였으며 재현성이 있는 것으로 나타나 잔류검사법으로 적합하다고 사료되어 보고한다.

참고문헌

1. Guyer, B.M. *J. Int. Med. Res.* **2**, 458 (1974).
2. De Castro, J.F., Carvalho, J.F.O., Moussatche, N., & De Castro, F.T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **7**, 487-493 (1975).
3. Minnisto, P.T. *Clin. Pharmacol. Ther* **19**, 37-46 (1976).
4. Kasuga, Y., Sugitani, A., & Yamada, F. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **23**, 344-347 (1982).
5. Kasuga, Y., Sugitani, A., & Yamada, F. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **24**, 484-487 (1983).
6. Hamamoto, K. *J. Chromatogr.* **381**, 453-456 (1986).
7. Nose, N., Hoshino, Y., Kikuchi, Y., Horie, M., Saitoh, K., Kawachi, T., & Nakazawa, H. *J.Assoc. Off. Anal. Chem.* **70**, 714-717 (1987).
8. Horii, S., Yasuoka, C., & Matsumoto, M. *J. Chromatogr.* **388**, 459-466 (1987).
9. Hustvedt, S.O., Salte, R., & Benjainsen, T. *J. Chromatogr.* **494**, 335-339 (1989).
10. Cuisinaud, G., Ferry, N., Seccia, M., Bernark, N., & Sassard, J. *J. Chromatogr.* **181**, 399-406 (1980).
11. Ikai, Y., Oka. H., Kawamura, N., Yamada, M., Harada, K., Suzuki, M., & Nakazawa, H. *J. Chromatogr.* **477**, 397-406 (1989).
12. Larocque, L., Schnurr, M., Sved, S., & Weninger, A. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 608-611 (1991).
13. Carignan, G., Larocque, L., & Sved, S. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 906-909 (1991).