



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

4.0cm

碩士學位論文(16pt.)

3.0cm

Oxytetracycline의 투여방법에 따른
넙치(*Paralichthys olivaceus*)
체내의 잔류특성(25pt.)

11cm

濟州大學校 産業大學院(16pt.)

1.0cm

生命産業工學科(14pt.)

1.0cm

高昌湜(16pt.)

2.0cm

2009年 7月(14pt.)

4.0cm

Oxytetracycline의 투여방법에 따른
넙치(*Paralichthys olivaceus*)
체내의 잔류특성

指導教授 許文洙

高昌湜

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2009年 7月

高昌湜의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 정준범 ①

委員 강봉조 ①

委員 허문수 ①

濟州大學校 産業大學院

2009年 7月

목 차

목 차	I
Abstract	III
List of Tables	IV
List of Figures	V
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	4
1. 공 시 어	4
2. 약제 투여방법 및 시료 채취	4
3. 잔류분석방법	5
3-1. 미생물학적 간이시험법(Bioassay)	5
3-1-1. 사용시약 및 시험균주	5
3-1-2. 아포부유액 조제	5
3-1-3. 시험용액의 조제	6
3-1-4. 시험용 평판의 조제	6
3-1-5. 시험용 평판의 검사	7
3-1-6. 시험조작	7
3-1-7. 판정	8
3-2. 정량분석	10
3-2-1. 사용기기 및 시약	10
3-2-2. OTC 추출	10
3-2-3. HPLC 분석조건	12
3-2-4. 검량선 작성 및 회수율 분석	14
III. 결과	14
1. 미생물학적 간이시험 결과	15
1-1. 약육처리구 분석결과	15

1-2. 경구투여구 분석결과	18
2. 정량분석 결과	20
2-1. 표준곡선	20
2-2. 회수율 조사	23
2-3. 약육처리구 분석결과	25
2-4. 경구투여구 분석결과	27
IV. 고찰	29
V. 참고문헌	32
감사의 글	35



ABSTRACT

Industrial advancement has resulted in food culture development followed by increase in seafood consumption and large-scale seafood farming, which has accompanied by diseases in fishes remarkably increasing every year. As a way of prevention and cure for bacterial diseases in fishes, the antibiotic OTC(Oxytetracycline) for sea creatures is widely in use. The problem is OTC is being overused to an extent that negative aspects are being reported. In view of this, this study conducted a research with regard to aspects of remnants on olive flounder's skin, liver and muscle through dipping treatment and oral feeding of OTC and analyzed the results with Bioassay and HPLC quantitative analyses. Dipping treatment was carried out once with 25 mg/ton/hour, and oral treatment with 62.5mg/kg body weight/7 day, both of which results underwent Bioassay analysis. The dipping group reacted only on the skin right after dipping, while the oral feeding group responded on the skin for 77th days after feeding and on the muscle for 14th days. HPLC quantitative analysis found the dipping group had remnants on the 37th day on the skin after dipping and on the 13th day on the liver; and there were no remnants on the muscle even right after dipping. The oral feeding group was found to have high concentration (1.07 mg/kg) of remnant on the skin even on the 77th day; 0.56 mg/kg on the liver even a small amount of it; and no remnant on the muscle on the 42nd day. To sum up the results from these analyses, it will not be harmful to our body to observe the OTC withdrawal period of 40 days with the muscle because OTC will hardly remain on it, while it is inappropriate to use the skin and the liver for broth after eating the live olive flounder for sashimi as they contain several times higher remnant quantity than on the muscle. Previous studies, however, have reported the concentration of remnants gradually decreases with heating, so it is likely to lessen depending on cooking temperature.

LIST OF TABLES

Table. 1. Systematic assumption antibacterial material by microbiological method.....	9
Table. 2. HPLC instrument and analysis conditions for oxytetracycline.....	13
Table. 3. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline dipping administration(25mg/ton/1 hour/1 day) in skin, muscle of olive flounder.....	17
Table. 4. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline oral feeding administration(62.5mg/kg body weight/7 day) in skin, muscle of olive flounder.....	19
Table. 5. Spiked Recovery in Muscle.....	24

LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Extraction procedure of oxytetracycline from the skin, the muscle, the liver of olive flounder.....11
- Fig. 2. Decision of bioassay method.....16
- Fig. 3. Chromatogram of 1.0 ppm standard solution.....21
- Fig. 4. Standard calibration curves of oxytetracycline by HPLC.....22
- Fig. 5. Plasma concentration of oxytetracycline in olive Flounder after dipping with concentration of 25ppm for 1 hour.....26
- Fig. 6. Plasma concentration of oxytetracycline in olive Flounder after oral feeding with concentration of 62.5mg/kg body weight.....28

I. 서론

산업의 발달과 더불어 건강에 대한 관심이 급증하면서 식생활 문화가 육류중심에서 야채 및 어패류 중심으로 변화하고 있다. 이에 따른 수산식품 및 활어의 소비가 증가하면서 1990년대 후반부터 국내 양식어업은 급속히 발전하여 생산규모가 대형화 되면서 양식현장에서의 어병발생도 매년 급증하여 그로 인한 경제적 피해가 상당한 비중을 차지하고 있으며, 그중에서도 에드워드병, 비브리오병, 연쇄구균병, 활주세균병등과 같은 다양한 세균성 질병이 많은 비중을 차지하는데 대처방법으로 주로 많은 항생제에 의존하고 있다.(Jung *et al.*, 2004)

그러나 어병의 예방 및 치료 목적으로 항생제의 사용은 어류양식의 생산성 향상에 커다란 기여를 하고 있는 것은 사실이나 항생제의 과다한 사용으로 인해 식용 어류에의 항생제의 잔류를 일으킬 수 있는데, 이는 항생제 내성의 증가로 치료실패, 경제적 비용의 증가를 초래할 뿐만 아니라, 직접적으로 섭취하는 사람에게 있어 부작용을 일으킬 수 있으며 잠재적으로 장내세균의 내성균의 획득의 문제를 야기 할 수 있다.

우리나라에서는 성분별로 약 30여종의 항균물질이 수산양식용으로 시판되고 있는데 (국립수의과학검역원, 2005) 이 중에서 Tetracycline계열인 OTC (Oxytetracycline)이 가장 많이 판매되고 있다.(Lee *et al.*, 2005; Coyne *et al.*, 2004) Tetracycline계 항생제는 그람 양성균과 그람 음성균의 성장을 억제하는 광범위 항생물질(Lu *et al.*, 2004)로서 토양균에서 생성되는 항생물질을 검사하다가 *Streptomyces aureofaciens*로부터 Chlortetracycline이 처음 발견된 이래, *Streptomyces rimosus*로부터 OTC가 분리되었으며 Democycline, Doxycycline, Minicycline 등은 근래에 소개된 Tetracycline계열 항생제이다. 특히 OTC는 Tetracycline계 항생제 중에서 가장 광범위한 항균범위를 나타낸다. Tetracycline계 항생제는 단백질 합성을 억제하는 정균항균제이며 일부는 수동적 확산에 의하여 일부는 에너지 의존성 능동적 운반에 의하여 세균내로 들어가게 된다. 세균내로 들어간 Tetracycline계 항생제는 30S ribosome에 가역적으로 결합하여 세균의 aminoacyl tRNA와 mRNA-ribosome의 결합을 억제하고, 이로 인하

여 peptide의 신장이 일어나지 않으며 단백질 합성이 억제된다. 모든 Tetracycline계 항생제는 인체에 오심, 구토, 상복부 통증 및 설사를 유발할 수 있으며 식도 궤양이 생길 수 있고 채장염이 생겼다는 보고도 있다. Tetracycline계 항생제는 칼슘과 쉽게 결합하여 신생골과 소아의 치아에 침착되기 때문에 임산부에 투약하게 되면 태아의 치아에 침착되어 변색 및 범랑질 이형성을 초래하고, 뼈에 침착되어 변형과 성장억제를 일으킬 수 있고 다량 투여할 경우 간괴사가 나타날 수 있어 OIE(Office international des épizooties, 국제무역사무국)에서는 Tetracycline계 항생제를 동물 및 사람의 건강상 중요하거나 또는 항생제 내성으로 인해 중요한 경제적 결과를 초래할 가능성이 있어 관리가 필요한 항생제로 규정하고 VCIA(Veterinary Critically Important Antimicrobials)로 분류하고 있다.

수산용의약품 사용안내(국립수산과학원, 2005)에 의하면 넘치인 경우 OTC는 1일 용량으로 체중 kg 당 62.5 mg이하의 양을 사료에 혼합하여 경구투여하고 약욕은 물 1톤당 5~25 g(30~60분 동안) 또는 2.5~5 g(24~48시간 동안)을 녹여서 사용하게 허가되어 있고 휴약기간은 40일로 규정하고 있으며 식품위생법상 OTC의 어체내 잔류허용기준은 Tetracycline, Chlortetracycline, OTC의 합으로 0.2 mg/kg이하로 규정되어 있다.

현재 우리나라의 축·수산물의 항생제 잔류검사법은 미생물학적 간이검사법(Bioassy)과 정량분석법으로 식품공전에 등재되어 있고 식약청, 수산물품질관리원 등에서 내수산 및 수입산 어패류에 대한 시험분석법으로 활용되고 있다. 미생물학적 간이검사법은 정량분석법과는 다르게 비용이 저렴하고 간단하게 많은 시료를 동시에 검사 할수 있는 장점을 가지고 있고 계열별 항생제 검출에 정확도가 높은 미생물 간이 검사법을 이용하면 비교적 검사시간 및 절차를 줄일 수 있으므로 대량의 제품에 대하여 빠르고 정확하게 식품에 잔류하고 있는 항생제를 검출 할 수 있게 된다. 미생물학적인 간이검사법은 4가지 미생물(*Bacillus megaterium* KCTC 2178, *Bacillus subtilis* KCTC 1022, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Bacillus stearothermophilus* KCTC 3067)을 이용하는 시험법으로 다양한 항생제 및 합성합균제 계열 중 일부 계열은 확인할 수 없고, 검출 가능한 잔류량을 파악할 수 없으며(Park *et al.*, 2008) 시료중의 자연적으로 존재할 수 있는 효소나 지방등이 시험균의 성장을 억제하거나 다른 계열의 항생제에 비특이반응이 일어날 수 있는 단점이 있다(Davis *et al.*, 1971). HPLC(High-performance

liquid chromatography)를 이용한 정량분석법은 정확한 항생제 종류 및 정밀한 분석결과를 알수 있으나 전처리과정에 많은 시간이 필요하고 고가의 시약 및 장비를 필요로 하는 단점이 있다.

최근 양식어류를 대상으로 사육환경 및 투약방법에 따른 항생제의 잔류특성에 대한 연구가 많이 진행 되었다. 수온에 따른 Norfloxacin의 잉어(*Cyprinus carpio*)와 뱀장어(*Anguilla japonica*)체내에서 약물통태학적 특성(Kim *et al.*, 2002), Chloramphenicol의 경구투여에 따른 양식넙치, *Paralichthys olivaceus*의 조직내 잔류량 및 혈액학적 변화(Jung *et al.*, 2004), 잉어에 있어서 Quinolones(Ciprofloxacin, Norfloxacin, Oxolinic acid)의 경구 투여에 따른 장기내 분포 상(Choi *et al.*, 2005), Amoxicillin의 경구투여에 따른 양식어류(넙치, 조피볼락, 참돔)의 근육조직내 잔류량의 변화(Jung *et al.*, 2006), Oxytetracycline과 tetracycline의 약육에 따른 양식어류(넙치, 조피볼락, 참돔)의 조직 내 잔류량의 변화(Kim *et al.*, 2006), Streptomycin의 약육에 따른 양식어류(넙치, 조피볼락, 참돔)의 근육조직내 잔류량의 변화(Kim *et al.*, 2007), Oxytetracycline의 약육 및 경구투여에 따른 넙치(*Paralichthys olivaceus*)체내 약물통태학적 특성(Jung *et al.*, 2008), Oxytetracycline의 경구투여에 따른 뱀장어 체내 약물통태학적 특성(Kim *et al.*, 2008) 등이 연구 되었으나 대부분이 혈액 및 근육에서의 잔류특성에 대해서만 주로 연구가 이루어 졌으며 그 외 피부 또는 간 등에서의 잔류특성에 대한 연구는 미약한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 넙치(*Paralichthys olivaceus*)를 대상으로 OTC의 약육과 경구투여에 따른 피부, 근육, 간의 잔류특성을 미생물학적 간이검사법과 HPLC 정량분석법으로 조사함으로써, 올바른 수산용 항생제 사용지도에 기초자료로 활용될 것이며 나아가 안전한 양식 수산물 생산에 기여하고자 본 연구를 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 공시어

넙치(*Paralichthys olivaceus*)는 항생제 투여치료를 받은 경력이 없는 건강한 어체를 고르게 선별하여 약육처리구, 경구투여구 각각 45마리, 51마리를 두개의 유수식 수조에서 3주간 순치시켰으며 평균 체중은 112 ± 17 g이었고 실험 기간 동안의 수온은 21 ± 0.5 °C이었으며, 매일 1회 평균 체중의 1%씩 사료를 급이하였다.

2. 약제 투여방법 및 시료채취

약제 투여방법에 따른 넙치 피부, 근육, 간의 잔류분석을 위하여 약육처리구와 경구투여구로 구분하였다. 약육처리구는 Oxytetracycline-HCL 표준품(Sigma)으로 OTC를 물 1톤당 25 g의 농도로 1시간 1회 실시 하였고 시료채취는 약육직후부터 약육후 6일까지는 매일 하였으며 그 이후는 6일간격으로 총 54일까지 3마리씩 시료를 채취하여 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다. 경구투여구는 Oxytetracycline-HCL 표준품(Sigma)으로 OTC의 투여농도를 어체중 kg 당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여하였고 시료채취는 경구투여후 1일부터 7일까지는 매일 하였으며 그 이후는 7일간격으로 총 77일까지 3마리씩 시료를 채취하여 -80 °C 초저온 냉동고에 보관하였다. 실험기간 동안 폐사한 실험어는 출현되지 않았다.

3. 잔류분석방법

3-1. 미생물학적 간이시험법(Bioassay)

3-1-1. 사용시약 및 시험 균주

본 실험에서 사용된 항생제 표준품은 Oxytetracycline-HCL(Sigma)제품을 사용하였으며, Trimethoprim(TMP)은 Fluka제품을 사용하였고, 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다. 실험기구로는 Streptomycin sensi-disk(BBL, 직경 6mm, 10 μ g, S-10), Petridish(Sewon medical)을 사용하였다. 배지로는 계대 및 증균용으로 nutrient agar(BBL), 아포제조용으로 A-K #2 sporulating(BBL), 시험용 배지로는 Mueller-Hinton agar(BBL), Antibiotic medium #2(BBL), Antibiotic medium #5(BBL), Antibiotic medium #8(BBL)를 사용하였고 시험용 균주로는 *Bacillus megaterium* KCTC 2178, *Bacillus subtilis* KCTC 1022, *Bacillus cereus* KCTC 1012, *Bacillus stearothermophilus* KCTC 3067을 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에서 분양받았다.

3-1-2. 아포부유액 조제

B. megaterium 아포부유액 조제는 보통배지에 계대보관되어 온 시험균을 37 $^{\circ}$ C에서 1일간 배양한 후 멸균생리식염수 2~3 ml에 현탁시킨 후 아포조제용 배지 300 ml를 넣어 균한 배양병(Roux bottle)에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 1일간 배양 후 실온에서 6일간 아포를 형성시킨다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균한 후 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한 후 분당 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척을 3회이상 반복하고 잔사를 멸균증류수에 부유시켜 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 재가열한다. 이를 멸균증류수로 10단계 희석하여 표준한천배지로 균수를 측정한 후 아포농도를 2×10^6 CFU/ml가 되도록 희석하여 사용한다.

B. subtilis 및 *B. cereus*의 아포부유액 조제는 Nutrient agar에 계대보관되어 온 시험균을 멸균생리식염수 5 ml에 현탁시킨 후 Nutrient agar 300 ml를 넣어

균한 배양병(Roux bottle)에 접종하여 37℃에서 1일간 배양한 후 멸균생리식염수 2~3 ml에 현탁시킨 후 아포조제용 배지 300 ml를 넣어 균한 배양병(Roux bottle)에 접종하여 37℃에서 1일간 배양한 후 실온에서 6일간 아포를 형성시킨다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균하여 65℃에서 30분간 가열한 후 분당 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균수에 부유시켜 세척을 반복하고 잔사를 멸균수에 부유시켜 65℃에서 30분간 재가열한다. 이 포자액은 MacFaland No. 1 정도 되게 멸균수로 희석 소분하여 냉장보관하여 사용한다.

*B. stearothermophilus*의 아포부유액 조제는 Nutrient agar에 계대, 보관되어온 균주를 멸균생리식염수 5 ml에 현탁시킨 후 Nutrient agar 300 ml를 넣어 균한 배양병(Roux bottle)에 접종하여 시험균을 55℃에서 1일간 배양한 후 멸균생리식염수 2~3 ml에 현탁시킨 후 아포조제용 배지 300 ml를 넣어 균한 배양병(Roux bottle)에 접종하여 55℃에서 1주일간 배양한다. 멸균유리구슬과 멸균증류수 25 ml를 넣어 집균한 후 85℃에서 15분간 가열한 후 분당 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척을 3회이상 반복하고 잔사를 멸균증류수에 부유시켜 85℃에서 15분간 가열한 후 아포액의 농도를 MacFaland No. 2 정도 되도록 희석 소분하여 냉장보관한다.

3-1-3. 시험용액의 조제

TMP(Trimethoprim)용액은 TMP 10 mg을 용량플라스크에 달아 메탄올 10 ml에 녹이고 멸균증류수를 넣어 100 ml로 한 후 15 µg/ml용액이 되도록 희석하여 *B. megaterium* 평판 조제시 사용한다.

3-1-4. 시험용 평판의 조제

B. megaterium 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존된 MH 배지 100 ml당 조제된 시험균액 1 ml와 TMP용액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 페트리접시에 8 ml씩 분주하여 수평으로 유지하여 응고시킨다.

B. subtilis 평판은 멸균 후 약 50℃로 가온 보존된 AM #5 배지에 100 ml당

조제된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작한다.

B. cereus 평판은 멸균 후 약 50 °C로 가온 보존된 AM #8 배지에 100 ml당 조제된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작한다.

B. stearothermophilus 평판은 멸균 후 약 50 °C로 가온 보존된 AM #2 배지에 100 ml당 조제된 시험균액 1 ml를 가하여 충분히 섞은 후 *B. megaterium* 평판과 같이 조작한다.

3-1-5. 시험용 평판의 검사

시험할 때마다 스트렙토마이신 감수성 디스크(10 µg)를 이용하여 각 시험용 평판의 감도를 확인한다. 즉, *B. megaterium*, *B. cereus*, *B. subtilis* 및 *B. stearothermophilus* 평판에서 스트렙토마이신 감수성 디스크의 저지환의 직경이 각 20 mm 이상되는 평판을 사용한다.

3-1-6. 시험조작

시료 3마리의 각각 피부는 점액질을 완전히 제거한 후 채취하여 3 g씩 동량 혼합 가능한 한 무균적으로 사방 1 cm 정도로 잘라 검사용 평판에 놓고 근육은 시료 3마리의 근육을 15 g씩 동량 채취하여 호모기나이저로 균질화한 후 사방 1 cm 정도의 모양으로 검사용 평판에 놓았고 간은 시료량이 부족하여 HPLC 정량분석에만 사용하였다. 이것을 약 1시간 냉장으로 방치한 후 페트리접시를 도치하지 않고 *B. megaterium*는 45 °C, *B. subtilis*는 37 °C, *B. cereus*는 30 °C, *B. stearothermophilus*은 55 °C에서 16~18시간 배양한다.

3-1-7. 판정

결과 판정은 시험평판의 주변 억제대 폭으로써 결과를 판정하였다. 시험평판의 주변 억제대 폭이 1.0 mm 이상인 것을 양성으로 판정하고 1.0 mm 미만의 미세한 반응은 위양성으로 판정한다. 양성으로 판정된 검체는 다음 Table. 1에 따라 항생 물질 또는 합성항균제의 계통을 추정할 수 있다.



Table 1. Systematic assumption antibacterial material by microbiological method

<i>B. cereus</i> (AM #8)	<i>B. subtilis</i> (AM #5)	<i>B. megaterium</i> (MH)	<i>B. stearothermophilus</i> (AM #2)	추정 물질 계통
++	+	±	±	Tetracycline계
-	+	++	±	Macrolide계
-	±	+	++	Penicillin계
-	+	±	-	Aminoglycoside계
-	-	-	±	Polyether계
-	-	+	±	Peptide계
-	-	±	-	Chloramphenicol
±	-	±	±	Novobiocin
-	-	+	-	설파제

3-2. 정량분석

3-2-1. 사용기기 및 시약

OTC의 잔류에 대한 정량적 분석을 위해 HPLC(SHISEIDO, JAPAN)를 사용하였으며 실험에서 사용된 항생제 표준품은 Oxytetracycline-HCL(Sigma)제품을 사용하였으며 시료중의 항생제 추출에는 acetonitrille, methanol(Merck), Oxalic acid, EDTA, Trichloroacetic acid(Sigma)등을 사용하였고 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다.

3-2-2. OTC 추출

시료 3마리의 피부와 간은 각각 1 g씩 정확히 달아 호모기나이저로 균질화 한 후 혼합하여 총 3 g을 실험에 사용하였고, 근육은 시료 3마리 각각 15 g씩 정확히 달아 호모기나이저로 균질화 한 후 총 10 g을 사용하였다. 피부, 간, 근육의 시료들을 각각 50 ml Conical tube에 취해 1% EDTA용액 10 ml, 10% Trichloroacetic acid(TCA)용액 10 ml를 가하여 균질기로 2분간 균질화 한다. 이 액을 4,000 rpm으로 3분간 원심분리후 상등액을 다른 50 ml Conical tube에 취하고 다시 1% EDTA용액 10 ml, 10% TCA용액 10 ml를 가하여 균질기로 2분간 균질화 한 후 4,500 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액을 전에 추출된 상등액이 들어있는 50 ml Conical tube에 합하여 다시 4,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 다른 50 ml Conical tube에 취한다. 이액을 활성화된 Sep-pak C₁₈ 카트리지(메탄올 20 ml, 증류수 10 ml, 5% EDTA 용액 10 ml를 순차적으로 흘려주어 활성화)에 흘린 후, 증류수 300 ml를 흘려 세척한다. 카트리지에 흡착된 성분은 메탄올 40 ml를 흘려 용출시키고, 용출액은 다시 감압하에서 농축기로 건조시킨다. 시험액이 건조된 수기에 이동상(0.01M Oxalic acid : Acetonitrille : Methanol = 9 : 2 : 1) 2 ml를 가하여 초음파세척기로 녹이고 0.45 µm 멤브레인필터로 여과한 후 HPLC로 분석한다. 시료의 전처리 과정에 대한 요약은 Fig. 1과 같다.

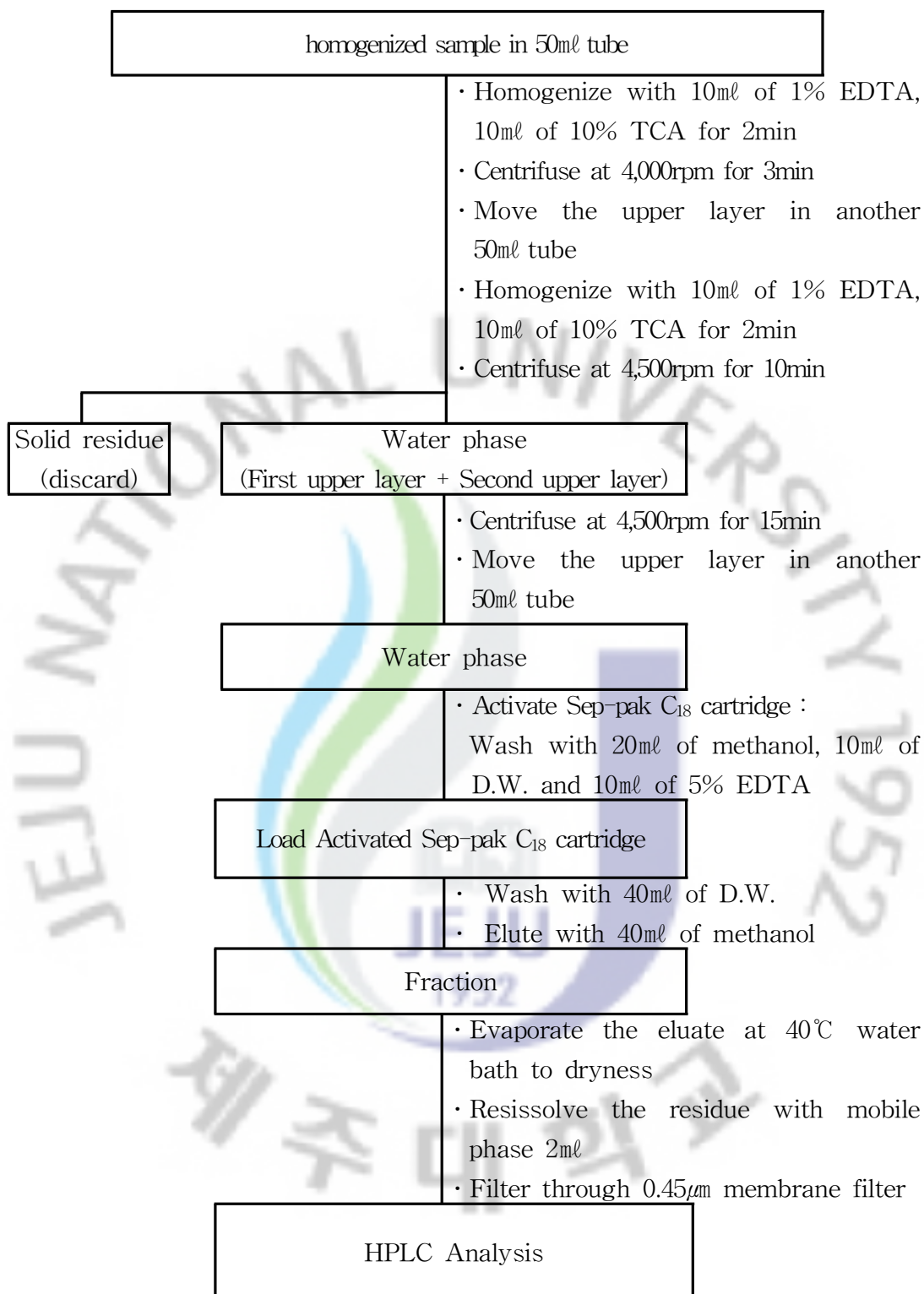


Fig. 1. Extraction procedure of oxytetracycline from the skin, the muscle, the liver of olive flounder.

3-2-3. HPLC 분석조건

HPLC(SHISEIDO, JAPAN)의 기기분석조건은 Table. 2에서 나타낸바와 같다. 즉 column은 4.6 × 250 mm i.d.(C₁₈, 5 μ m, SHISEIDO), 이동상은 0.01M Oxalic acid, Acetonitrille,Methanol을 9 : 2 : 1의 비율로 혼합, column 온도는 35 $^{\circ}$ C, Flow rate는 1 ml/min, UV detector 파장은 360 nm, Injection volume은 50 μ l, Run time은 10 min으로 하였다.



Table 2. HPLC instrument and analysis conditions for oxytetracycline

Instrument	SHISEIDO, NANOSPACE SI-2
Column	4.6 × 250mm i.d.(C ₁₈ , 5μm, SHISEDO)
Mobile phase	0.01M Oxalic acid-Acetonitrille-Methanol (100 : 200 : 900, v/v/v)
Column temperture	35°C
Flow rate	1ml/min
UV Detector	360nm
Injection volume	50μl
Run time	10min

3-2-4. 검량선 작성 및 회수율 분석

표준용액은 OTC-HCL(Sigma)를 정확히 달아 메탄올로 용해시켜 100 ppm의 표준 용액을 조제하였고 이 용액을 이동상으로 희석하여 0.1, 1.0 ppm의 농도로 하여 농도에 peak 면적 비를 이용하여 표준곡선을 작성하였다.

시료에 대한 회수율은 근육에 1.0 ppm 농도로 spiking하여 시료의 OTC 추출방법에 따라 추출 및 정제한 후, HPLC에 주입하여 표준곡선과 Retention time을 비교하여 정성 확인한 후, 해당 peak의 면적 값을 표준용액의 직선회귀방정식에 대입하여 농도를 구한 후, 아래의 식에 의해 계산하였다.

$$\text{회수율(\%)} = \frac{\text{시료에서 회수된 OTC의 농도}}{\text{시료에 첨가된 OTC의 농도}} \times 100$$

또한 시료에서의 잔류농도 계산은 시료를 정제하고 HPLC에 주입하여 표준용액과 동일한 Retention time에 있는 peak의 면적값을 표준물질의 회귀방정식에 대입하여 농도를 구한다음 아래의 식에 의해 시료량으로 나누고 회수율을 보정하여 잔류농도를 구하였다.

$$\text{잔류농도}(\mu\text{g/g}) = \frac{\text{시료에서의 농도} \times 100}{\text{시료량(g)} \times \text{회수율(\%)}}$$

Ⅲ. 결 과

1. 미생물학적 간이검사 결과

1-1. 약욕처리구 분석결과

미생물학적인 간이검사의 결과는 Fig. 2.과 같은 방법으로 결과를 판정하였다. 그리고 Table 3에는 OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 1시간 약욕한 후 시간경과에 따라 넙치 3마리씩 채취하여 피부는 각각하고 근육은 동량 혼합하여 미생물학적 간이시험법으로 잔존 유무 분석결과를 나타내었다. *B. stearothermophilus* 평판에서는 약욕직후 피부에서만 의양성을 보이고 약욕후 1일째부터는 반응이 일어나지 않았다. *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* 평판에서는 어떤 시료에서도 반응이 일어나지 않았다.

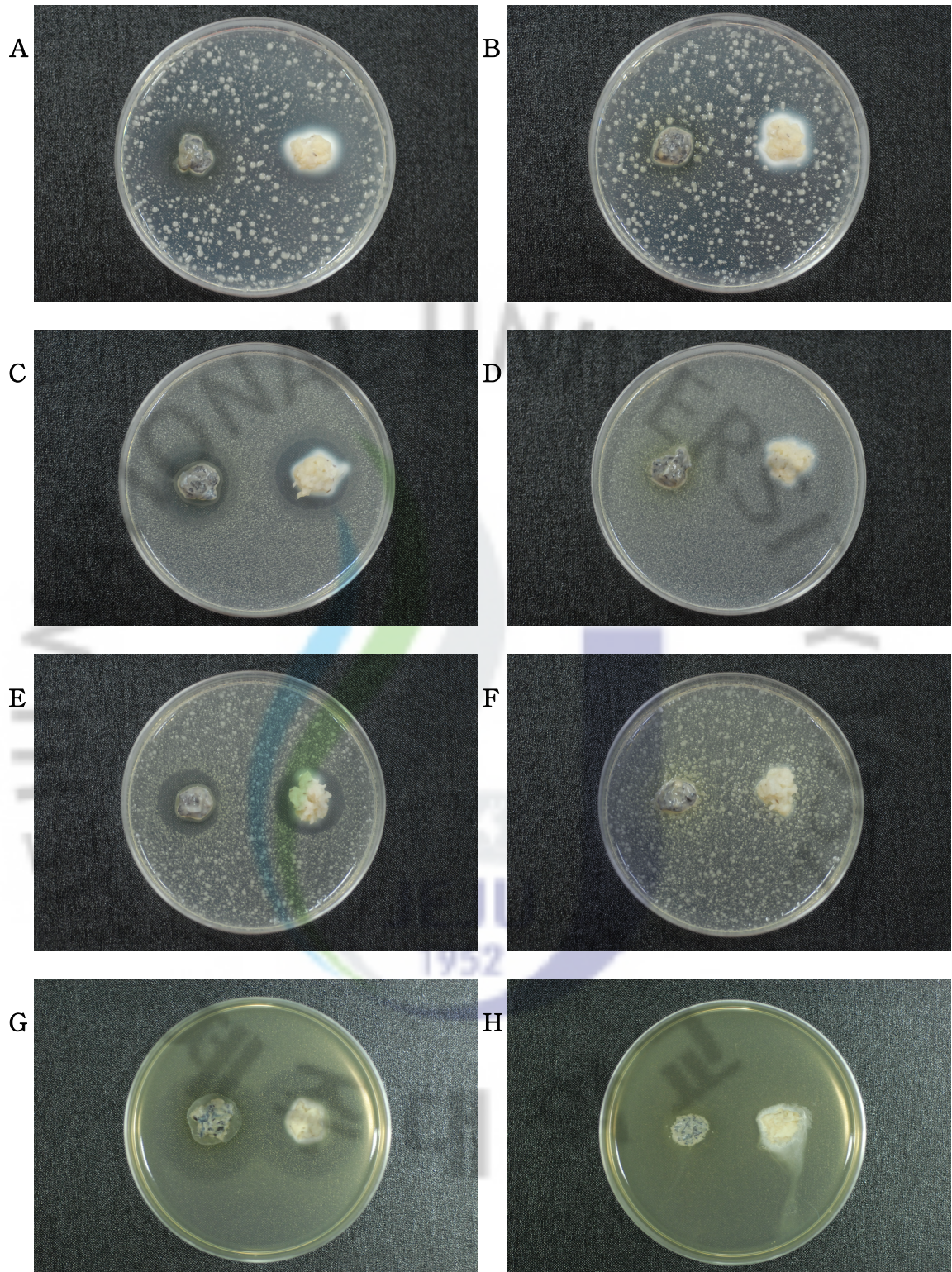


Fig. 2. Decision of Bioassay method in each strain inoculated medium.
 A, Positive reaction in *B. megaterium* ; B, Negative reaction in *B. megaterium* ;
 C, Positive reaction in *B. subtilis* ; D, Negative reaction in *B. subtilis* ;
 E, Positive reaction in *B. cereus* ; F, Negative reaction in *B. cereus* ;
 G, Positive reaction in *B. stearothermophilus* ; H, Negative reaction in *B. stearothermophilus*

Table 3. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline dipping administration(25mg/ton/1 hour) in skin, muscle of olive flounder

Day after administration	<i>B. stercorarius</i>		<i>B. megaterium</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>	
	Screening test		Screening test		Screening test		Screening test	
	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct
0	±	-	-	-	-	-	-	-
1	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-	-	-
30	-	-	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-	-	-
42	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-

1-2. 경구투여구 분석결과

Table. 4에는 OTC를 어체중 kg당 62.5mg 의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여한 후 시간경과에 따라 넙치 3마리씩 채취하여 피부는 각각하고 근육은 동량 혼합하여 미생물학적 간이시험법으로 잔존 유무 분석결과를 나타내었다.

B. stearotheophilus 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였고 근육에서는 경구투여후 5일째부터 의양성을 보인후 7일째부터 반응이 보이지 않았고 피부에서는 경구투여후 28일째까지 양성을 보이다가 35일째부터 의양성을 보인후 실험종료 즉 경구투여후 77일째까지 의양성을 보였다.

B. megaterium 평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였고 근육에서는 경구투여후 2일째부터 의양성을 보인후 4일째부터 반응이 보이지 않았고 피부에서는 경구투여후 5일째까지 양성을 보이다가 6일째부터 의양성을 보인후 경구투여후 7일째까지 의양성을 보이다가 14일째부터 반응이 보이지 않았다.

B. cereus 평판에서는 경구투여후 1일째부터 피부 및 근육에서 양성을 보였고 근육에서는 경구투여후 7일째부터 의양성을 보인후 21일째부터 반응이 보이지 않았고 피부에서는 경구투여후 14일째까지 양성을 보이다가 14일째부터 의양성을 보인후 경구투여후 21일째까지 의양성을 보이다가 28일째부터 반응이 보이지 않았다.

Table 4. Residual oxytetracycline detected by Bioassay after oxytetracycline oral feeding administration(62.5mg/kg body weight/7 days) in skin, muscle of olive flounder

Day after administration	<i>B. stearotherophilus</i>		<i>B. megaterium</i>		<i>B. subtilis</i>		<i>B. cereus</i>	
	Screening test		Screening test		Screening test		Screening test	
	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct	Skin direct	Muscle direct
1	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	±	+	±	+	+
3	+	+	+	±	+	±	+	+
4	+	+	+	-	+	-	+	+
5	+	±	+	-	+	-	+	+
6	+	±	±	-	+	-	+	+
7	+	-	±	-	±	-	+	±
14	+	-	-	-	-	-	+	±
21	+	-	-	-	-	-	±	-
28	+	-	-	-	-	-	±	-
35	±	-	-	-	-	-	±	-
42	±	-	-	-	-	-	-	-
49	±	-	-	-	-	-	-	-
56	±	-	-	-	-	-	-	-
63	±	-	-	-	-	-	-	-
70	±	-	-	-	-	-	-	-
77	±	-	-	-	-	-	-	-

2. 정량분석 결과

2-1. 표준곡선

OTC 표준용액을 0.1, 1.0 mg/l의 농도로 희석하여 HPLC로 분석하였는데 Retention time은 5.08 분(Fig. 3.)으로 조사되었고 농도에 따른 peak 면적비를 이용하여 표준곡선을 작성한 결과 OTC의 r^2 은 0.999으로 양호한 직선성($r^2 > 0.995$)을 나타내었다(Fig. 4).



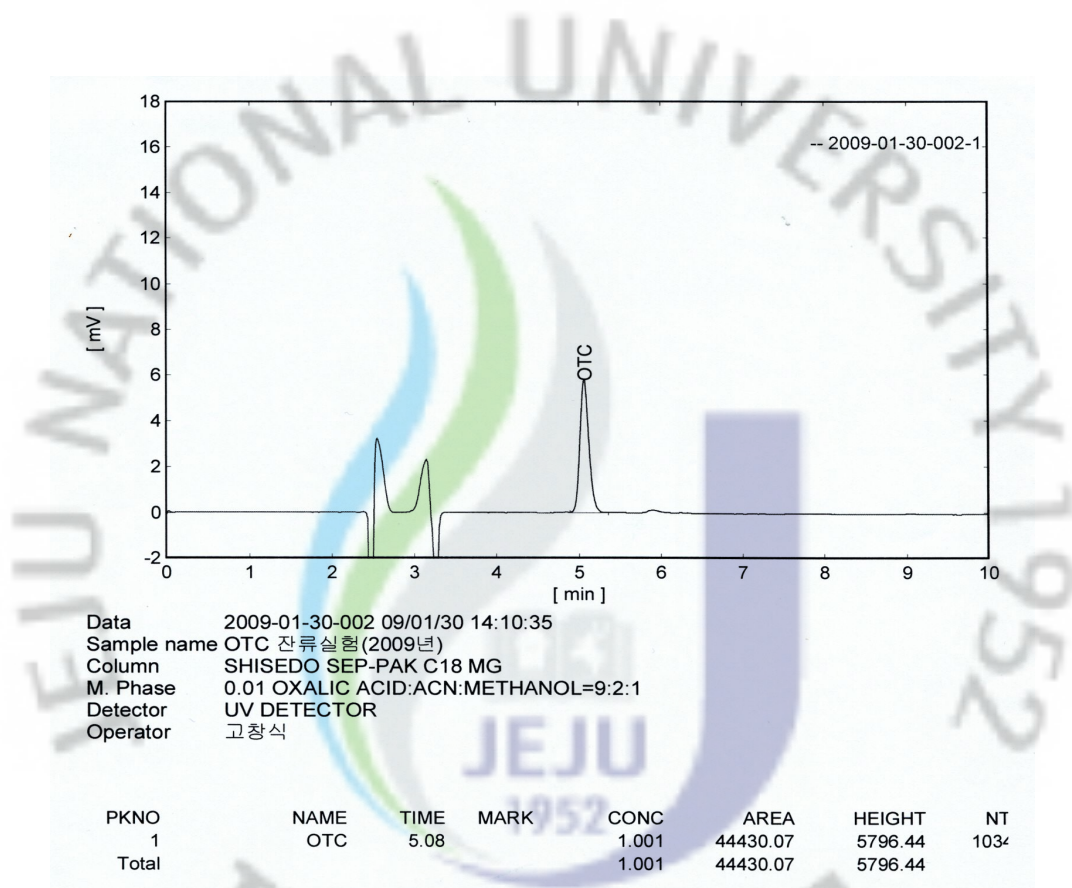


Fig. 3. Chromatogram of 1.0 ppm standard solution.

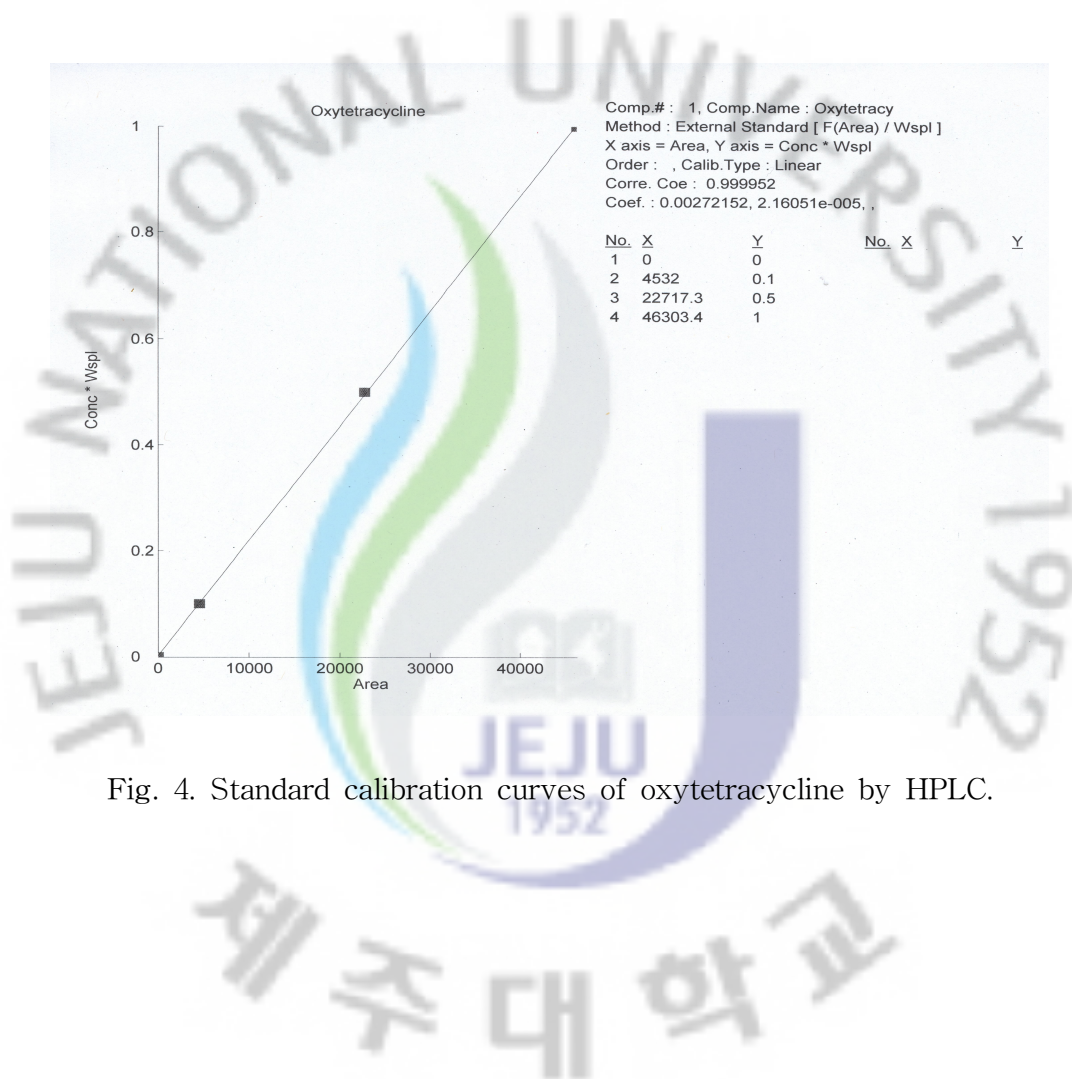


Fig. 4. Standard calibration curves of oxytetracycline by HPLC.

2-2. 회수율조사

시료에 대한 회수율은 OTC의 표준용액을 넙치의 근육에 1.0 mg/kg의 농도로 spiking하여 앞서 기술한 방법에 따라 전처리한 후, HPLC로 측정한 결과이며 Table. 5에서와 같이 약육처리구는 평균 80.43%, 경구투여구는 평균 76.71%의 회수율을 보였다.



Table 5. Spiked Recovery in Muscle

Sample	Spiked concentration (mg/kg)	Recovery(%)
		OTC (Mean \pm SD, n=5)
Dipping Group	1.0	80.73 \pm 13.34
Oral feeding Group	1.0	76.71 \pm 5.33

2-3. 약욕처리구 분석결과

OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 넙치에 1시간 약욕한 후 시간경과에 따른 피부, 근육, 간의 농도변화를 Fig. 5에 나타내었다. 피부에서는 약욕직후 0.51 mg/kg의 농도를 보인후 지속적으로 감소경향을 보이며 약욕후 24일째부터는 0.16 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준(0.2 mg/kg) 이하로 측정되었으며 약욕후 48일째부터는 농도가 검출한계농도이하(0.05 mg/kg)로 관찰되었다. 근육에서는 약욕직후부터 검출한계농도이하로 관찰되었다. 간에서는 약욕직후 0.09 mg/kg의 농도를 보인후 지속적으로 증가경향을 보이다가 4일째에 최고농도인 0.25 mg/kg까지보이다가 점차감소하여 5일째부터는 0.18 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준이하로 측정되었으며 약욕후 19일째부터는 농도가 검출한계농도이하로 관찰되었다.



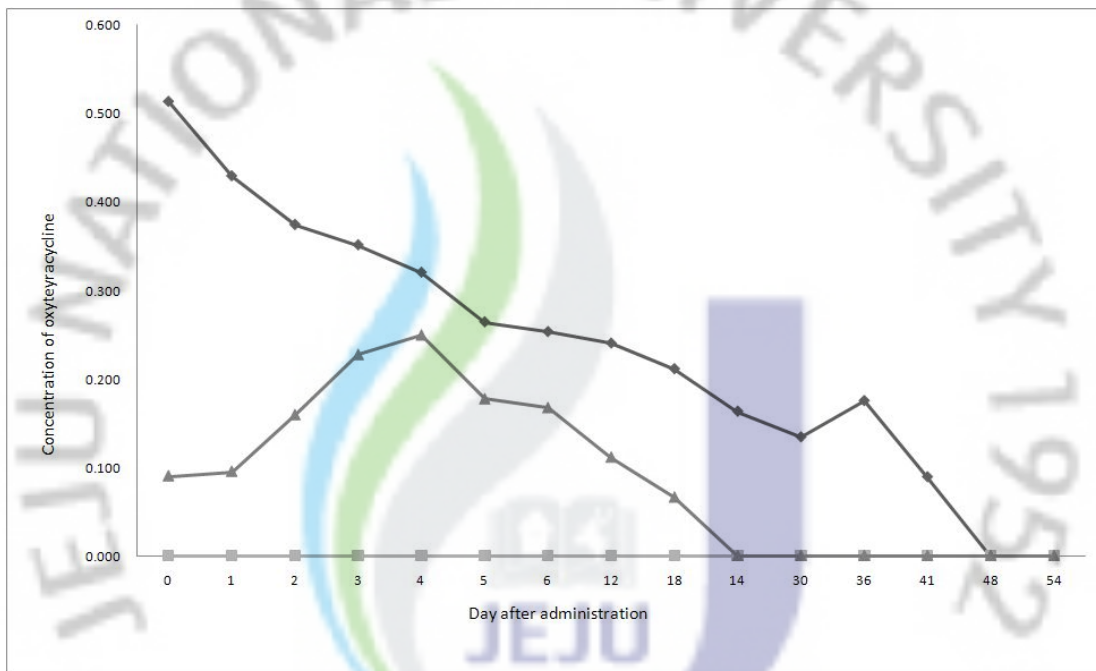


Fig. 5. Plasma concentration of oxytetracycline in olive flounder after dipping with concentration of 25ppm for 1 hour.

Skin, —◆— ; Muscle, —■— ; Liver, —▲—

2-4. 경구투여구 분석결과

OTC를 어체중 kg당 62.5mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여한 후 시간경과에 따른 피부, 근육, 간의 농도변화를 Fig. 6에 나타내었다. 피부에서는 경구투여후 1일째 3.28 mg/kg농도를 보인후 점차 감소경향을 보이며 측정종료일인 경구투여후 77일째까지 1.07 mg/kg의 높은 농도를 보였다. 근육에서는 경구투여후 1일째에 0.83 mg/kg의 농도를 보인후 지속적으로 감소경향을 보이면서 경구투여후 14일째부터는 0.13 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준이하로 측정되었으며 경구투여후 42일째부터는 농도가 검출한계농도이하로 관찰되었다. 간에서는 경구투여후 1일째에 1.91 mg/kg의 농도를 보인후 지속적으로 감소경향을 보이면서 경구투여후 21일째부터는 0.17 mg/kg으로 어류에서의 OTC 잔류허용기준이하로 측정되었으며 측정종료일인 경구투여후 77일째까지 0.06 mg/kg의 농도를 보였다.



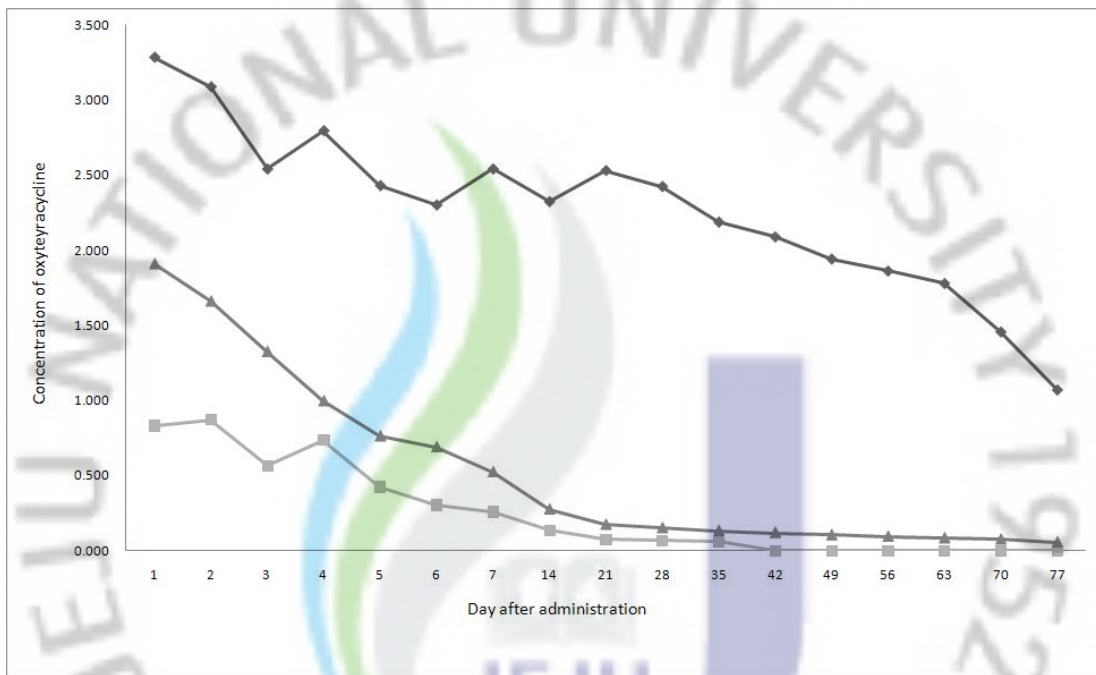


Fig. 6. Plasma concentration of oxytetracycline in olive flounder after oral feeding with concentration of 62.5mg/kg body weight/7 days.

Skin, —◆— ; Muscle, —■— ; Liver, —▲—

IV. 고 찰

OTC(Oxytetracycline)는 광범위 항생제로서 현재 양식어장에서 가장 많이 사용하고 있는 항생제이며 어체에 잔류한 수산식품을 섭취했을시 인체에 부작용 또한 심각하여 우리나라뿐만 아니라 대부분의 선진 외국에서 안전휴약기간과 잔류허용기준을 설정하여 운영하고 있다. 그에 따른 수산물의 항생제 잔류검사법은 미생물학적 간이검사법(Bioassy)과 정량분석법으로 식품공전에 등재되어 있고 식약청, 수산물품질관리원 등에서 내수산 및 수입산 어패류에 대한 시험분석법으로 활용되고 있다. 본 연구에서는 타 연구에서와는 달리 OTC의 약육 및 경구투여에 따른 넙치의 가식부위인 피부, 근육, 간의 잔류특성을 미생물학적인 간이검사법과 HPLC 정량검사법으로 조사함으로써 OTC의 부적절한 사용으로 인한 부작용을 줄이고 안전한 양식수산물을 생산하기 위한 목적으로 이 연구를 수행하였다.

OTC를 물 1톤당 25 g 농도로 넙치에 1시간 약육한 약육처리구와 OTC를 어체중 kg당 62.5 mg의 양을 사료에 혼합시켜 7일간 경구투여한 경구투여구로 구분하여 실험하였다. 그리고 미생물학적 간이검사법을 이용하여 넙치 피부, 근육에 대한 잔류특성을 분석하였고 HPLC 정량분석법을 이용하여 넙치 피부, 근육, 간의 잔류특성을 분석하였다.

미생물학적 간이검사에 의한 분석결과는 약육처리구의 피부에서는 약육직후에서만 *B. stearothermophilus* 평판에서 양성을 보였고 근육에서는 모든 균주의 평판에서 음성으로 조사되었다. 경구투여구 피부에서는 *B. stearothermophilus* 평판에서 경구투여후 77일째, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서 경구투여후 7일째, *B. cereus* 평판에서 경구투여후 28일째까지 양성을 보였고, 근육에서는 *B. stearothermophilus* 평판에서 경구투여후 6일째, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서 경구투여후 4일째, *B. cereus* 평판에서 경구투여후 14일째까지 양성을 보였다. Jung *et al.*(1998)에서 넙치에 OTC를 체중 kg 당 100 mg으로 1회 강제 투여하여 시간경과에 따른 *B. cereus* 평판에서의 반응을 조사하

였는데 경구투여후 20일째에 의양성 반응이 조사되어 비록 OTC의 투여량과 경구투여하는 방법과 기간이 다르지만 본 실험에서는 6일정도 잔류기간의 차이가 있었다.

HPLC에 의한 정량분석 결과를 보면 회수율은 근육에 1.0 ppm의 농도로 Spiking하여 평균 77%~81%의 회수율을 보였는데 이는 Kim *et al*(2006)의 연구에서 근육에 OTC를 본 실험과 같은 농도로 Spiking한 회수율(약 80%)과 거의 같은 값으로 조사되었다. 약육처리구에서는 피부에서 약육직후의 농도가 0.51 mg/kg이었고 점차 감소하여 약육후 24일에 OTC의 잔류허용기준치(0.2 mg/kg)이하로 조사되었고 약육후 48일이 지나서야 검출한계농도(0.05 mg/kg)이하로 측정되었다. 근육에서는 약육직후부터 검출한계농도이하로 측정되었으며 간에서는 약육직후 농도가 0.09 mg/kg으로 측정된 후 점차 증가하다가 약육후 4일째에 최고농도 0.25 mg/kg으로 측정된후 점차 감소하기 시작하여 약육후 5일째에 OTC의 잔류허용기준치이하로 측정되었으며 약육후 13일째가 되어서 검출한계농도이하로 측정되었다. 경구투여구에서 피부에서의 OTC의 잔류경향은 경구투여후 1일째부터 3.28 mg/kg의 높은 농도로 측정되었으며 점차 감소하기 시작하여 미생물학적 간이검사에서는 양성반응이 나타났던 시험종료일인 경구투여후 77일째에도 1.07 mg/kg의 농도로 측정되었고, 근육에서는 경구투여후 1일째에 0.83 mg/kg의 농도를 보인후 점차 감소하기 시작하여 경구투여후 14일째에 OTC의 잔류허용기준치이하인 0.13 mg/kg의 농도가 측정되었으며 경구투여후 42일째에 검출한계농도이하로 측정되었고, 간에서는 경구투여후 1일째의 농도가 1.91 mg/kg로 측정된 후 점차감소하기 시작하여 경구투여후 21일째에 OTC의 잔류허용기준치이하인 0.17 mg/kg의 농도가 측정되었으며 시험종료일인 경구투여후 77일째에도 0.06 mg/kg의 농도가 측정되었다.

미생물학적 간이검사법과 HPLC를 이용한 정량분석법간의 결과를 비교해 볼때 약육처리구의 피부시료인 경우 약육직후 *B. stearothermophilus* 평판에서만 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.51 mg/kg이었고, 경구투여구 피부시료인 경우 *B. stearothermophilus* 평판에서 경구투여후 77일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 1.07 mg/kg, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여후 7일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 2.54 mg/kg, *B. cereus* 평판에서는 경구투여후 28일째까지 양성을 보였는데 이때의 정량분석결과는 2.42 mg/kg이었다. 경구투여구 근육시료에서는 *B. stearothermophilus* 평판

에서 경구투여후 6일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.304 mg/kg, *B. megaterium* 평판과 *B. subtilis* 평판에서는 경구투여후 4일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.73 mg/kg, *B. cereus* 평판에서는 경구투여후 14일째까지 양성반응을 보였는데 이때의 정량분석결과는 0.13 mg/kg 이었다. 피부보다 근육에서 낮은 농도에서 양성을 보였는데 이는 피부와 근육을 같은 크기로 평판에 올려 놓았지만 피부와 근육의 조직량이 다르기 때문에 이러한 결과를 낳았다고 생각되나 피부에서의 잔류농도가 높기 때문에 미생물학적 간이시험법으로 항생제 잔류검사를 해야할때는 피부와 근육을 같이 병행실험을 해야 될 것이라고 사료된다.

본 연구를 종합하여 보면 우리가 어류양식장에서 사용하고 있는 OTC는 여러 세균성질환의 치료제로 사용하고 있는데 우리가 횡감으로 먹고있는 활넙치인 경우 근육에서는 OTC의 휴약기간인 40일을 준수하면 OTC는 거의 잔류하지 않아 우리몸에 무해하지만 영양물질의 중간대사 또는 저장, 해독 등의 중요한 역할을 하는 간과 어체의 몸의 표면을 보호하고 감각작용을 하는 역할을 하는 피부는 근육에 남아있는 OTC의 잔류량보다 몇 배의 높은 수치를 나타내었는데 이 잔류량으로 보아 횡감용 활넙치를 주 목적인 회로서 섭취를 하고 나머지 부산물인 피부, 간 등을 이용한 탕종류로서의 간과 피부의 사용은 부적절한 것으로 나타났다. 하지만 시판중인 육류중의 항생물질 잔류량과 가열에 의한 분해(Bae *etc al.*, 1991)에 관한 연구와 시판중인 뱀장어중의 oxolinic acid 잔류량과 가열에 의한 변화(Kim *etc al.*, 1998)에 관한 연구에서처럼 활넙치 근육 및 부산물에 잔류하는 OTC의 잔류량도 조리온도에 따라 감소할 것으로 추측되어진다.

본 연구에서 다소 미흡한 점은 경구투여구에서 OTC의 휴약기간이 40일이라 거기에 준하여 실험어를 준비하였더니 근육부위를 제외한 피부와 간에서 OTC가 77일이상 오래도록 잔류함으로써 실험어가 부족하여 OTC의 소멸시점을 알아내지 못하였는데 차후 추가실험을 하여 알아 내고자 하고 피부인 경우 다른 부위보다 월등히 높은 OTC농도를 보였는데 이 것에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

본 연구를 통하여 OTC의 투여경로별 어체의 조직별 잔류특성을 조사함으로써, 향후, 양식어류에 사용되고 있는 다양한 항생제들에 대해 조직내 잔류분포 연구를 촉진하고 항생제의 효율적인 사용을 통한 잔류 및 내성균의 출현을 방지하는데, 기초 자료로 활용될 것을 기대한다.

V. 참고 문헌

- Bae, K.C. and Y.G. Lee. (1991) Studied on the content and heat decomposition of residual tetracyclines in meats on the market. Kor. J. Food Hygiene 6(2) : 83-87.
- Choi, M.S. and K.H. Park. (2005) Distribution of quinolones(ciprofloxacin, norfloxacin and oxolinic acid)after oral administration in carp(*Cyprinus carpio*). J. Fish Pathol., 18(3) : 269-276.
- Coyne, R., Ø. Bergh and O.B. Samuelsen. (2004) One-step liquid chromatographic method for the determination of oxytetracycline in fish muscle. Journal Chromatography B, 810 ; 325-328.
- Chung, H.S., S. Kim, W. Min and H.J. Lee. (2006) Muscle tissue distribution level of amoxicillin in olive flounder(*Paralichthys olvaceus*), rockfish(*Sebastes schlegeli*), and red sea bream(*Pagrus major*) follwing oral administration. J. Fd Hyg. Safety 21(4) : 244-249.
- Davis, W.W. and T.R. Stout. (1971) Disc plate method of mocrobiological antibiotic assy. American Society for Microbiology, Applied Microbiology, Oct : 659-665.
- Lu, H.T., Y. Jiang, H.B. Li, F. Chen and M.H. Wong. (2004) Simultaneous determination of oxytetracycline, doxycycline, chlortetracycline in tetracycline antibiotics by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Chromatographia 2004, 60, September NO. 5/6.

- Jung, S.H., D.L. Choi, J.W. Kim, J.S. Seo and B.Y. Jee. (2008) pharmacokinetics of oxytetracycline in olive flounder(*Paralichthys olvaceus*) by dipping and oral administration. J. Fish Pathol., 21(2) : 107-117.
- Jung, S.H. and J.W. Kim. (2000) In vitro antimicrobial activity in combination of antibacterials against fish-pathogenic bacteria. J. Fish Pathol., 13(1) : 45-51.
- Jung, S.J., J.S. Seo, H.K. Eom, N.Y. Kim, S.H. Lee, M.D. Huh, H.D. Jung and J.K. Chung. (2004) Tissue level of chloramphenicol and haematological changes in olive flounder,*Paralichthys olvaceus* orally administered chloramphenicol. J. Fish Pathol., 17(2) : 113-121.
- Lee, H.J., T.S. Lee, K.T. Son, P.H. Kim, M.R. Jo, M.J. Park and Y.H. Yi. (2005) Analysis of tetracyclines using high-performance liquid chromatography for fishery products. J. Kor. Fish. Soc. 38(6) ; 372-378.
- Kim, K.H., M.R. Song, S.N. Choe, M.S. Choe and K.H. Park. (1998) Oxolinic acid residue in the cultured eel tissues and its change to heating process. J. Fd Hyg. Safety 13(1) ; 14-19.
- Kim, S., M.S.. Chun, H.C. Chung, W.C. Jung, D.h. Kim, H.Y. Shon, W. Min, and H.J. Lee. (2007) Muscle tissue distribution level after dipping administration of streptomycin in olive flounder(*Paralichthys olvaceus*), rockfish(*Sebastes schlegeli*), and red sea bream(*Pagrus major*) J. Fd Hyg. Safety 22(1) ; 23-28.

Kim, S., H.S. Chung, S.J. Kang, J.Y. Ha, W.C. Jung, S.H. H대, Y.W. Shin, K.W. Kim, D.G. Kim and H.J. Lee. (2006) Tissue distribution after dipping administration of oxytetracycline and tetracycline in olive flounder(*Paralichthys olvaceus*), rockfish(*Sebastes schlegeli*), and red sea bream(*Pagrus major*) J. Fish Pathol., 19(2) : 155-164.

Kim, S.H. and Y.H. Park. (2008) Antimicrobial resistance and food safety. J. Fd Hyg. Safety 3 ; 30-36.

Kim, J.D., J.S. Seo, J.W. Kim, J.S. Lee, S.H. Jung, B.Y. Jee, J.W. Kim and E.O. Kim. (2008) Pharmacokinetics of oral administration of oxytetracycline in eel, *Anguilla japonica*. J. Fish Pathol., 21(2) : 119-127.

Kim, J.W., S.H. Jung, J.S. Lee, D.L. Choi and M.R. Jo (2002) Effects of temperature on the Pharmacokinetics of norfloxacin in carp(*Cyprinus carpio*) and eel(*Anguilla japonica*). J. Fish Pathol., 15(2) : 49-56.

Park, M.H. T.W. Kim, N.U. Jo, J.Y. Jeong, S.H. Lee, J.O. Lee and H.Y. Kim (2008) Evaluation and improvement of bioassay for residual antibiotics in foods. Kor. J. Microbial. Biotechnol, 36(4) ; 360-365.

국립수산과학원. (2005) 수산용의약품 사용안내. 10-11.

국립수의과학검역원 (2005) 연도별(2001~2004년)항생제 판매실적. 125-149.

감사의 글

먼저 논문을 준비하면서 힘들고 포기하고 싶을때 세심한 관심과 많은 깨달음을 주셨던 허문수 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 또한 바쁘신 가운데도 저의 논문을 심사해 주신 정준범 교수님께도 감사드립니다.

그리고 너무나 부족한 저를 학업의 길로 이끌어 주시고 항상 곁에서 지켜봐 주신 제주특별자치도해양수산자원연구원 강봉조 연구사님께 깊은 감사의 말씀을 전합니다. 또한 지치고 힘들때 많은 위로와 힘을 주시는 김필연 연구사님께도 감사드리고 오랜친구이자 동생같은 현정에게도 감사드립니다.

직장생활을 하면서 많이 부족한 저를 잘 배려해주시는 제주특별자치도해양수산자원연구원의 오익심 원장님, 고희범 팀장님, 김문관 팀장님을 비롯한 여러 연구원분들과 직원여러분들께 감사드립니다.

논문을 준비하는 동안 많은 도움을 준 병규형, 영건형, 영환형, 철영형, 만철, 주상, 태원, 윤범, 봉근, 용제, 익수, 창영, 정용, 준석 그외 해양미생물 실험실 선후 배님들께 감사의 말씀을 전합니다. 그리고 짧은시간 이었지만 같이 근무하면서 많은 도움을 주고 받았던 경주에게도 감사드립니다.

여기에 이름을 올리지 못했지만 많은 관심과 격려를 해주신 많은 분들께 감사의 마음을 전합니다.

끝으로 아직도 저를 보살펴주시고 걱정하시는 부모님과 항상 많은 힘과 용기를 주시는 형님들과 형수님들께 감사의 말씀을 전합니다. 철없을때 만나 여기까지 올 수 있게 삶의 원천이 되어준 우리 사랑하는 아내와 눈에 넣어도 아프지 않을 것 같은 우리 은재와 원재에게 이 논문을 바칩니다.