

네모파 흡착 벗김 전압전류법에 의한 플루오로퀴놀론 계 항생제의 검출

부한길 · 송연주[†] · 박세진^{††,*} · 정택동^{†,*}

성신여자대학교 나노바이오응용기술센터

[†]서울대학교 화학부

^{††}성신여자대학교 기초과학연구소

Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents by Square Wave Adsorptive Stripping Voltammetry

Hankil Boo, Youn Joo Song[†], Sejin Park^{††,*}, and Taek Dong Chung^{†,*}

*The Cooperative Center for Nano-Bio Applied Technology, Sungshin Women's University, 249-1 Dongsun-dong,
Seongbuk-gu, Seoul 136-742, Republic of Korea*

[†]*Department of Chemistry, Seoul National University, Seoul 151-747, Republic of Korea*

^{††}*Basic Science Research Institute, Sungshin Women's University, 249-1 Dongsun-dong, Seongbuk-gu, Seoul 136-742,
Republic of Korea*

(Received February 1, 2010 : Accepted February 9, 2010)

초 록

플루오로퀴놀론 계 항생제들의 전기화학적 거동을 카본 페이스트 전극 (carbon paste electrode ; CPE)을 사용하여 순환 전압전류법 (cyclic voltammetry)과 네모파 흡착 벗김 전압전류법 (square wave adsorptive stripping voltammetry)으로 연구하였다. Enrofloxacin (ENR), Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP), Ofloxacin (OFL), Levofloxacin (LEV) 등 5가지 플루오로퀴놀론 계 항생제에 대한 전기화학적 분석을 수행하였다. pH 4.5인 아세트산 완충 용액 (acetate buffer) 에서 플루오로퀴놀론 계 항생제의 산화 전위는 Ag/AgCl 기준 전극에 대하여 각각 ENR : 0.952 V, NOR : 1.052 V, CIP : 1.055 V, OFL : 0.983 V, LEV : 0.990 V 의 값을 나타내었으며, 네모파 흡착 벗김 전압전류법에 의한 산화 전류는 0.2 μ M에서 1 μ M 사이의 농도영역에서 각 항생제의 농도와 선형을 나타내었다.

Abstract : Electrochemical behavior of fluoroquinolone antibacterial agents on carbon paste electrode (CPE) were investigated by cyclic voltammetry and square wave adsorptive stripping voltammetry. The fluoroquinolone antibacterial agents tested in this study were Enrofloxacin (ENR), Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP), Ofloxacin (OFL) and Levofloxacin (LEV). In acetate buffer at pH 4.5, the oxidation peak potentials of the fluoroquinolone antibacterial agents of ENR, NOR, CIP, OFL, and LEV were 0.952 V, 1.052 V, 1.055 V, 0.983 V, and 0.990 V (vs. Ag/AgCl), respectively. And their oxidation peak currents from square wave adsorptive stripping voltammograms are proportional to the concentration of each antibacterial agent over the range from 0.2 μ M to 1 μ M.

Keywords : Fluoroquinolone, Antibacterial agents, Carbon paste electrode, Square wave adsorptive stripping voltammetry

*E-mail: tdchung@snu.ac.kr, parksejin70@naver.com

1. 서 론

날리딕식산 (nalidixic acid)으로부터 합성되는 플루오로퀴놀론 (fluoroquinolone)계 항생제는 이중방향족 (heteraromatic), 이중환 (bicyclic structure)을 가지고 있어 DNA 복제에 필요한 효소인 DNA 자이레이스 (DNA gyrase)와 결합하여 DNA 합성 자체를 막아 세균의 증식을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 그람 양성 세균, 그람 음성 세균 등의 미생물에 탁월한 효과를 가지는 것으로 보고되고 있어 의학과 수의학 분야에서 치료 목적으로 널리 사용되고 있다.¹⁾ 또한, 축산물과 수산물의 세균성 질병의 방지 및 치료를 위해서 축수산용 항생제로 플루오로퀴놀론 계 항생제를 많이 사용하기도 한다.

그러나 이들 항생제의 오남용으로 인한 문제들도 또한 심각한 문제가 되고 있다. 예컨대, 식품 중에 잔류하고 있는 항생제를 사람이 섭취하게 되면 잔류 항생제 때문에 체 내의 세균들이 항생제에 대한 내성을 가지게 되고, 세균들이 내성을 지니게 된 후에는 질병의 치료를 위하여 항생제를 투여하여도 치료가 안되거나 더디게 되는 부작용이 발생한다. 이와 같이 잔류 항생제가 인체에 미치는 영향은 간과할 수 없는 심각한 문제로 지적되고 있다.²⁾ 이러한 문제는 축수산물의 경우에도 마찬가지이다. 축수산물 가공 전후에 잔류 항생제 검출 검사가 반드시 필요한데, 현재 보고되어 있는 항생제의 검출 방법으로는 high performance liquid chromatography (HPLC),³⁻⁷⁾ UV-visible,⁸⁾ fluorescence Detection^{6,9)}을 이용한 분석법이 있다. 이 분석법들은 정확한 검출이 가능하고 극미량의 검출에도 좋은 성능을 보여준다. 그러나 장비의 가격이 비싸며 장비를 사용하기 위한 별도의 공간이 필요하고 사용하는데 있어 해당장비에 충분히 숙련된 전문가가 필요하다는 단점이 있다.

반면, 본 연구에서 보고하는 전기화학적 검출법은 기존의 검출 방법들이 가지고 있는 성능을 유지하면서, 사용의 편리성, 낮은 비용 등의 장점을 가지고 있다.¹⁰⁾ 더욱이 퀴놀론 계 항생제들은 전기화학적으로 활성을 지니고 있어서 전기화학적 방법을 이용한 검출법을 적용하는데 아주 유리하다.

본 연구에서는, 플루오로퀴놀론 계 항생제인 Enrofloxacin (1-Cyclopropyl-7-(4-ethyl-1-piperazinyl)-6-fluoro-1,4-dihydro-4-oxo-3-quinolone carboxylic acid ; ENR), Norfloxacin (1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinyl-1H-quinoline-3-carboxylic acid ; NOR), Ciprofloxacin (1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazinyl-quinoline-3-carboxylic acid ; CIP), Ofloxacin (9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid ; OFL), Levofloxacin ((-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1,2,3-de]-1,4-benzoxazine-6-carboxylic acid hemihydrate (I) ; LEV) 등 5 가지의 물질에 대한 전기화학적 거동을 확인하였다. 아울러 네모파 흡착 벗김 전압전류법 (square wave adsorptive stripping voltammetry)으로 각 항생제들을 검출하였다. 실험에 사용한 5 가지 항생제의 구조식은 Fig. 1에 나타내었다.

항생제의 검출을 위하여 본 연구에서 적용한 네모파 흡착 벗김 전압전류법은 전기화학적 검출 방법 중 매우 빠르고 민감한 측정법이다. 이 측정법을 이용하여 매우 낮은 농도의 항생제를 검출할 수 있음을 보이고, 항생제의 종류와 관계없이 항생제의 총량을 측정하였다. 이로써 축수산 현장에서 사용되는 각 항생제의 종류와 종류별 농도에 대한 정보는 불분명하더라도 그 총량을 규제할 수 있는 빠르고 간편한 방법론을 제시하고자 한다.

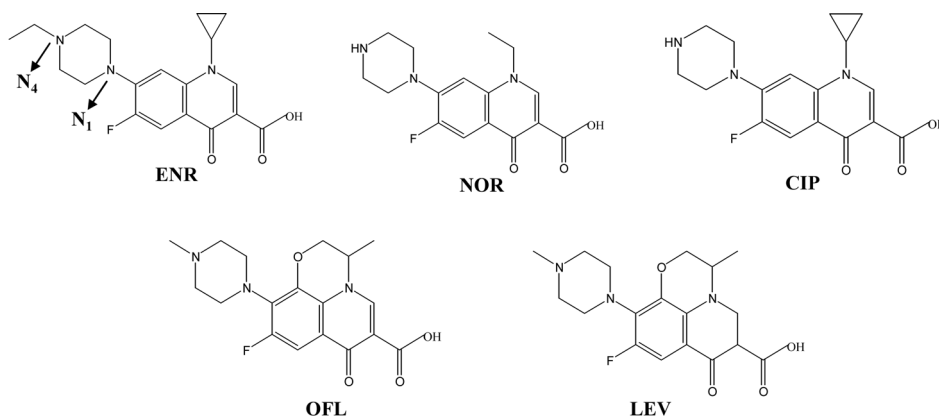


Fig. 1. Chemical structures of Enrofloxacin (ENR), Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP), Ofloxacin (OFL) and Levofloxacin (LEV).

2. 실험

2.1. 시약

플루오로퀴놀론 계 항생제인 Enrofloxacin (ENR), Norfloxacin (NOR), Ciprofloxacin (CIP), Ofloxacin (OFL), Levofloxacin (LEV) 은 Sigma-Aldrich 에서 구매하였다. 각 항생제 표준용액 (1 mM)은 증류수에 제조되었다. 0.1 M acetate buffer (pH 4.5)는 sodium acetate와 acetic acid 로 제조하였고 실험 시 사용되는 전해질로 사용되었다.

2.2. 기기 및 장치

모든 전기화학 측정은 CHI660A 전기화학 워크스테이션 (CH Instrument, USA) 에서 수행하였다. 카본 페이스트 전극 (CPE)을 작업 전극으로, 백금선과 Ag/AgCl, KCl (3 M) 전극을 각각 상대 전극과 기준 전극으로 사용하였다. 작업 전극의 겉보기 면적은 0.0314 cm^2 이다.

2.3. 전극

카본 페이스트 전극 (CPE)은 100 mg 그래파이트 파우더 (graphite powder) 와 1 mg 미네랄 오일을 혼합하여 제조되었다. 그런 다음 유리관으로 구멍이 있는 전극 몸체를 만들어 카본 페이스트를 채워 넣은 후 유산지에 연마작업을 하여 전극 표면이 매끄러워지게 만들었다. 각 측정 실험 후에는 CPE의 사용된 표면을 제거하고 새로운 표면으로 교체해 사용하였다.

2.4. 전기화학적 측정 방법

CPE 전극은 pH 4.5 acetate buffer 용액에서 순환 전압전류법 (cyclic voltammetry)으로 0 V~1.2 V vs. Ag/AgCl 에서 순환 전압전류도 (cyclic voltammogram)가 안정하게

나올 때까지 반복하였다. 그 다음 각 $10 \mu\text{M}$ 의 항생제에 대한 순환 전압전류도를 얻고 $0.2 \mu\text{M}$ 에서 $1 \mu\text{M}$ 사이의 다양한 농도에서 네모파 흡착 벗김 전압전류법으로 보정 곡선을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

CPE는 실험에 사용된 후 전극 표면에 흡착된 항생제가 완전히 제거되지 않고 남아 있어서 같은 전극으로 반복 측정할 경우 감도에 영향을 미치기 때문에 실험한 후에는 카본 페이스트를 교체하여 새로운 전극 표면으로 측정하였다.

전해질 용액의 pH도 산화 전류의 크기에 영향을 미친다. 보고된 바에 따르면, 산화피크가 크게 나타나는 전해질 조건은 Norfloxacin와 Levofloxacin의 경우 pH 5.0의 아세트산 완충용액이며,^{11,12)} Ciprofloxacin의 경우는 pH 4.0의 인산 완충용액¹³⁾ 등이다. 본 연구에서는 각 항생제들이 혼합되어 있는 시료에서의 총량 분석을 고려하여 0.1 M 아세트산 완충용액 (pH 4.5)를 전해질로 사용하였다.

측정실험 전처리 단계로 CPE를 0 V~1.2 V vs. Ag/AgCl 영역(0.1 M Acetate buffer, pH 4.5)에서 안정적인 전류도가 나올 때까지 전압 순환시킨 후에 항생제의 산화 전위를 측정하였다.

먼저, 다섯 가지 항생제 가운데 ENR에 대하여 순환 전압전류법으로 전기화학적 거동을 살펴보고, 네모파 전압전류법으로 보정 곡선을 구하였다. Fig. 2를 보면, 약 0.7 V vs. Ag/AgCl 이후부터 ENR이 산화되기 시작하여 0.889 V vs. Ag/AgCl 에서 산화 피크가 나타나며 1.1 V vs. Ag/AgCl 이후에는 용매인 물이 산화되기 시작한다. (Fig. 2(A)) 이 조건에서 네모파 전압전류법을 이용하여 보정곡선을 얻었는데,

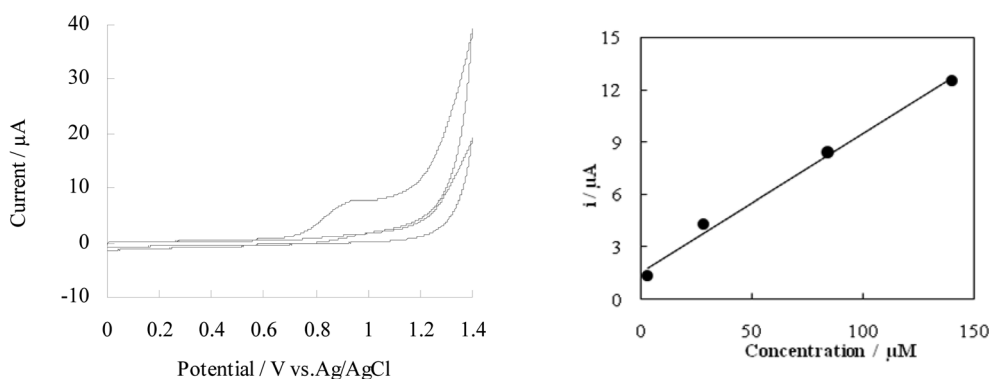


Fig. 2. Cyclic voltammograms and calibration curves of ENR without adsorption of ENR at the electrode surface. Cyclic voltammograms were acquired under the following conditions; the concentration of ENR and scan rate were $10 \mu\text{M}$ and 100 mVs^{-1} , respectively. Dashed line is the results of background solution. Calibration curve was obtained by square wave voltammetry. The parameters of the square wave adsorptive stripping voltammetry are frequency $f = 60 \text{ Hz}$, pulse amplitude = 50 mV , and scan increment $s = 10 \text{ mV}$.

(Fig. 2(B)) 이 때의 민감도 (sensitivity)는 $0.476 \mu\text{A } \mu\text{M}^{-1}$ 이며, 검출 한계는 $1 \mu\text{M}$ 에 미치지 못한다. 이러한 민감도와 검출 한계는 항생제 센서로서 적절하지 못하므로 민감도와 검출 한계를 향상하기 위하여 각 항생제가 녹아 있는

용액에 CPE를 0 V vs. Ag/AgCl 에서 120초 동안 노출하여 항생제가 전극 표면에 충분히 흡착되도록 한 후 순환 전압전류법을 이용해 산화 거동을 관찰하였다.

Fig. 3 는 CPE 에서 각각 $10 \mu\text{M}$ 농도의 ENR, NOR,

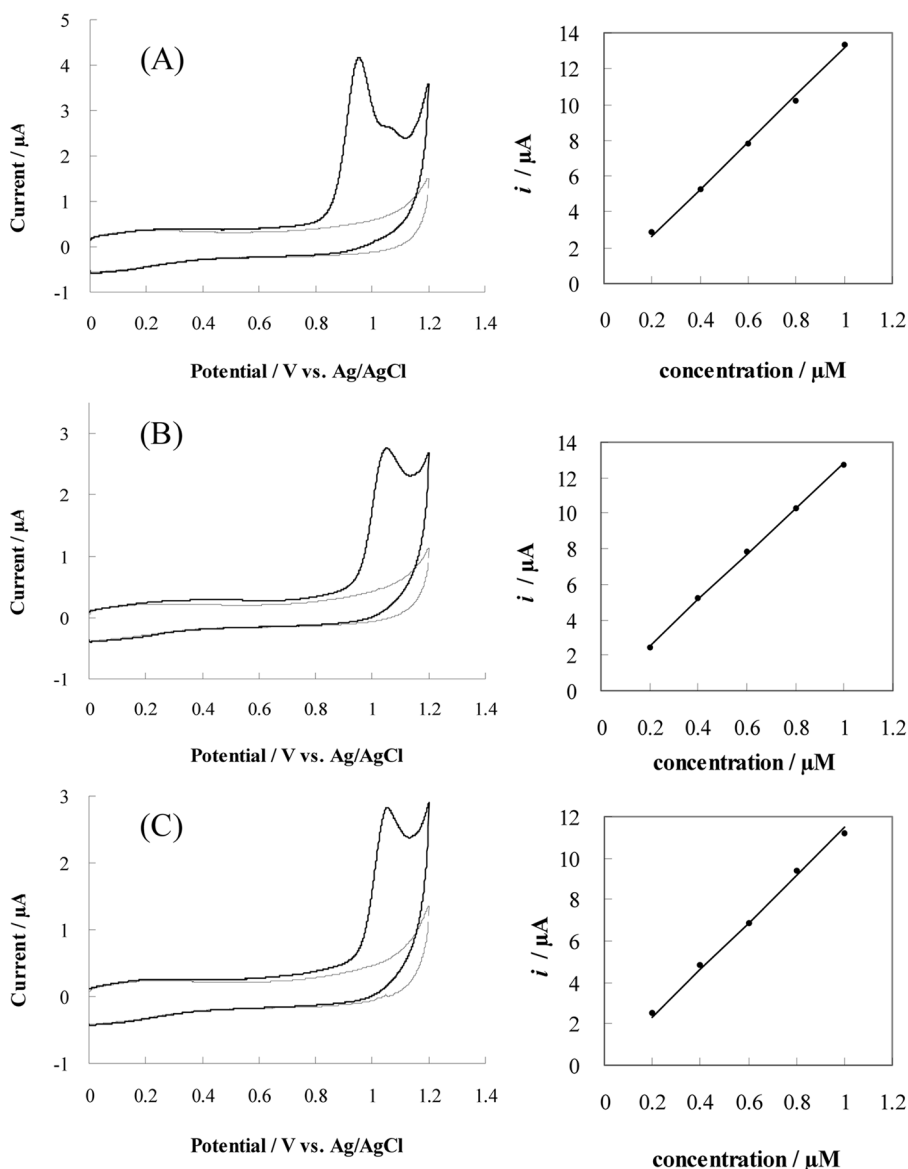


Fig. 3. Cyclic voltammograms and calibration curves of fluoroquinolone antibacterial agents in acetate buffer (0.1 M, pH 4.5) with adsorption at the electrode surface. (A) ENR, (B) NOR, (C) CIP, (D) OFL, and (E) LEV. Cyclic voltammograms were acquired under the following conditions; the concentration of each fluoroquinolone antibacterial agent and scan rate were $10 \mu\text{M}$ and 100 mVs^{-1} , respectively. Dashed and solid lines are the results before and after accumulation at 0 V vs. Ag/AgCl for 120 s. Calibration curves were obtained by square wave adsorptive stripping voltammetry. The parameters of the square wave adsorptive stripping voltammetry are frequency $f = 60 \text{ Hz}$, pulse amplitude = 50 mV, and scan increment $s = 10 \text{ mV}$.

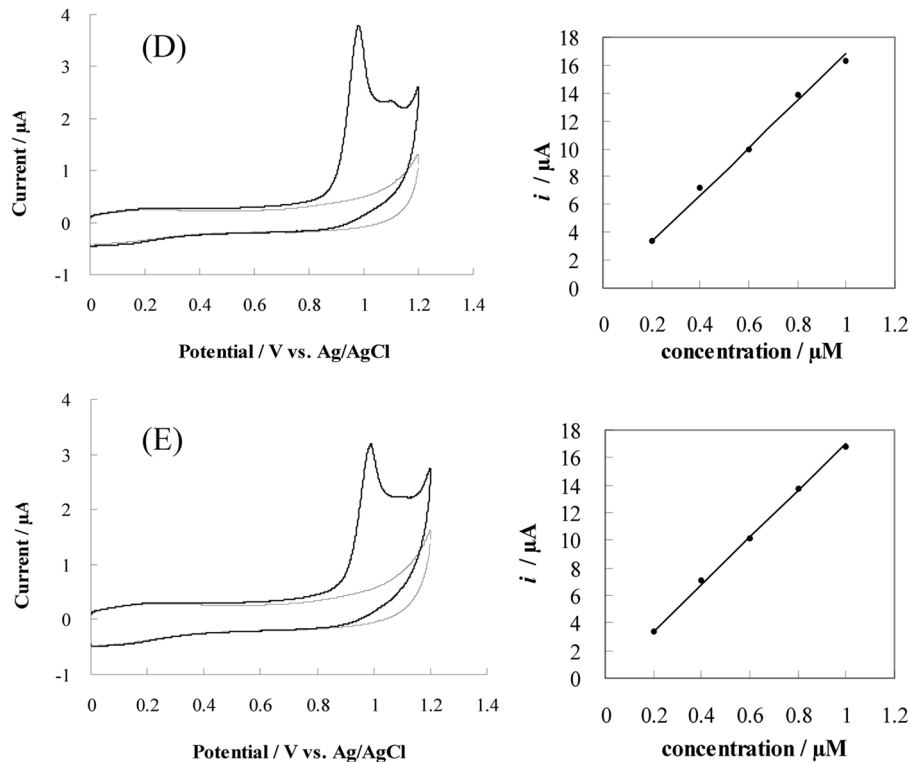


Fig. 3. Continued.

CIP, OFL, LEV의 순환 전압전류도와 네모과 흡착 벗김 전압전류법으로 측정된 항생제의 농도와 전류의 관계를 도식한 그래프이다. Table 1에 각 항생제의 산화 전위를 표기하였는데, 다섯 가지 항생제들의 산화 전위를 비교하면 $ENR < OFL < LEV < NOR \approx CIP$ 순서로 낮은 산화 전위를 가지고 있음을 알 수 있다. 같은 플루오로퀴놀론계 항생제임에도 불구하고 ENR과 CIP의 산화 전위는 100 mV 이상 차이가 나는 것을 볼 수 있는데, 이 물질들의 구조식을 비교해보면 ENR에는 N_4 위치에 에틸기 (ethyl group)가 결합해 있는 것에 비해 CIP에는 N_4 위치에 수소가 결합해 있는 것을 알 수 있다. ENR과 CIP의 구조식에서 N_4 부분을 제외한 다른 부분이 똑같다는 것을 고려하면 N_4 위치에 결합한 작용기의 특성이 항생제의 산화 전위에 영향을 주는 것으로 추정된다. 두 항생제에 각각 결합해 있는 에틸기와 수소의 특성을 비교하면 에틸

기가 수소에 비하여 더 좋은 전자 주개 작용기 (electron-donating group)이다. 한편 CIP와 같이 N_4 위치에 수소가 있는 NOR은 산화 전위가 CIP와 거의 같다. 에틸기와 수소의 중간 정도 되는 전자 주개 작용기인 메틸기 (methyl group)를 N_4 위치에 가지고 있는 OFL과 LEV는 서로 비슷한 산화 전위를 가지고 있으며, ENR과 CIP의 사이의 값임을 보여주고 있다. 결론적으로 플루오로퀴놀론계 항생제에서 N_4 의 위치에 어떤 작용기가 결합해 있는가에 따라 산화 반응에 의한 검출을 위해서 요구되는 전위가 달라져야 함을 알 수 있다.

한편, ENR과 OFL의 경우 다른 항생제들과는 달리 전압전류도에서 두 번째 산화 피크가 관찰된다. 또한 LEV도 두 번째 산화 피크가 아주 작게 보이고 있다. 퀴놀론계 항생제의 전기화학적 산화 메커니즘은 아직 정확하게 규명되어 있지 않아서 상세한 논의를 하기는 어려우나, 이 세 가지 항생제들은 다른 두 가지 항생제 NOR, CIP에 비하여 산화 피크 전위가 더 낮은 공통점이 있고, 용매로 사용한 물의 산화되는 전위와 간격이 상대적으로 더 있다. 따라서 처음 산화된 후 물이 산화되기 전에 두 번째 산화 피크가 관찰되는 것으로 보인다. 그에 비하여 NOR와 CIP는 첫 번째 산화 피크의 전위와 물이 산화되는 전

Table 1. Oxidative peak potential and sensitivity of ENR, NOR, CIP, OFL and LEV

	ENR	NOR	CIP	OFL	LEV
E_{ox}/V vs. Ag/AgCl	0.952	1.052	1.055	0.983	0.990
sensitivity/ $\mu A \mu M^{-1}$	13.36	12.72	11.20	16.32	16.77

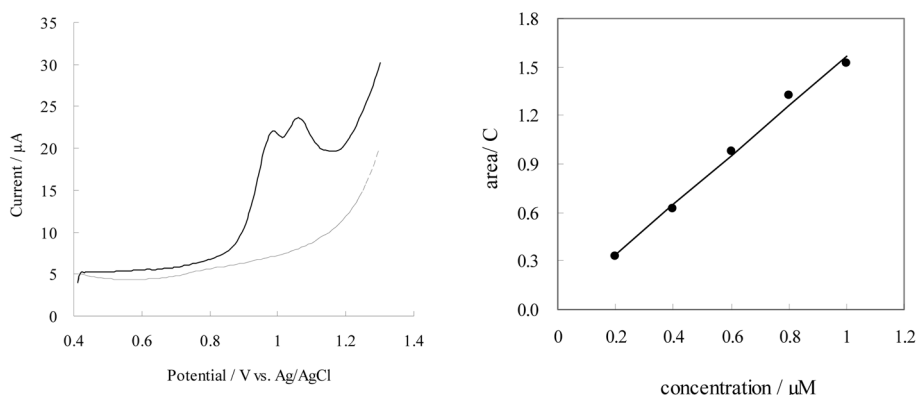


Fig. 4. Determination of total concentration of ENR, NOR, CIP, OFL and LEV. (A) Square wave adsorptive stripping voltammogram of the solution mixed with 5 antibiotics (ENR, NOR, CIP, OFL, LEV). Dashed and solid lines are the results before and after accumulation at 0 V vs. Ag/AgCl for 120 s, respectively. (B) Calibration curves for the total concentrations from 0.2 to 1.0 μM of the antibiotics were plotted based on square wave adsorptive stripping voltammograms.

위와 너무 가까워 두 번째 산화 피크가 드러나지 못하고 첫 번째 산화 피크의 전류와 물의 산화 전류에 묻혀진 것으로 추정된다.

각 항생제에 대한 보정 곡선은 0.2 μM 에서 1 μM 사이의 농도 범위에서 얻었으며, 보정 곡선을 그리기 위하여 각 농도에서의 첫 번째 산화 피크의 전류 값을 취하는 방법과 산화 전류의 전체 면적을 취하는 방법이 있는데, 여기서는 산화 피크의 전류 값을 취하였다. 산화 전류의 전체 면적을 취하여 보정 곡선을 작성하지 않은 이유는 전체 면적을 취하려고 할 경우, 항생제에 따라 물의 산화에 기인하는 전류와 겹치게 되어 오히려 정확한 보정 곡선을 얻는데 적절하지 못하기 때문이다. 각 항생제들의 보정 곡선으로부터 계산한 민감도를 Table 1에 표기하였다. 각 항생제의 민감도를 서로 비교하였을 때의 결과는 산화 전위의 비교 결과와는 조금 다른 경향을 보여주고 있다. 산화 전위를 비교하면 중간 정도의 산화 전위를 가지고 있는 OFL과 LEV가 민감도 측면에서는 ENR보다 더 큰 값을 가지고 있는 것으로 나타났다. 전체적으로 반응 속도 면에서는 $\text{OFL} \approx \text{LEV} > \text{ENR} > \text{NOR} > \text{CIP}$ 순으로 나타났다. 이 부분에 대해서는 전극의 표면 상태, 각 항생제의 흡착 정도 등의 변수를 고려하여 좀 더 자세한 후속 실험과 고찰이 필요한 것으로 보인다.

Fig. 4는 다섯 가지 항생제를 균등하게 섞어 총 농도가 1 μM 인 아세트산 완충용액 (pH 4.5)에서 네모파 흡착 벗김 전압전류법으로 얻은 전압전류도와, 항생제의 총 농도가 0.2 μM 에서 1 μM 사이의 범위에서 얻은 보정 곡선을 보여주고 있다. 예상대로 산화 피크가 하나로 나타나지 않고 각 항생제들의 산화 피크가 혼재한 형태로 전압전류도가 나타남을 알 수 있으며, 산화 피크 전위 영역이 0.95 V~1.05 V vs. Ag/AgCl 에서 존재하고 있다.

이렇게 혼합된 시약의 산화 피크가 하나로 나타나지 않는 경우, 항생제 각각에 대하여 보정 곡선을 얻은 경우와 달리, 산화 피크의 크기를 측정하여 보정 곡선을 도식하는 것은 적절하지 않다. 그 대신 각 농도에서 산화 전류가 흐르는 면적을 측정하여 보정 곡선을 얻었다. 이런 방법을 통하여 얻은 결과로부터 항생제의 총 농도와 측정된 면적 간에 비례 관계가 있음을 확인하였다. 항생제의 총량 검출 실험에서 얻은 민감도는 $1.52 \text{ C } \mu\text{M}^{-1}$ 이다.

이와 같은 실험 결과가 축수산 현장에서 의미 있는지를 검증하기 위하여 실제로 농장에서 닭들이 마시는 축산용 음용수를 채취하여 실험하였다. 이 음용수에는 ENR이 항생제로 포함되어 있는데, 실험해 본 결과 산화 전위 영역 내에서 ENR에 해당하는 산화 반응 외에 다른 산화 반응은 관찰되지 않았다.

즉, 네모파 흡착 벗김 전압전류법과 같은 전기화학적 측정법으로 항생제의 개별적인 검출뿐만 아니라 축수산 현장에서 개별적인 항생제에 대한 정보가 없다 하더라도 현장에서 사용하고 있는 항생제의 총량을 검출해 낼 수 있는 가능성을 확인할 수 있다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 각 항생제 및 총량 분석에 있어서 검출 한계를 더 낮추기 위하여 탄소 페이스트에 촉매 또는 전자 매개체 (electron mediator) 등을 첨가하여 전극의 반응 속도를 증가시키거나 전극 표면에 기능성 막을 적용하여 좀더 우수한 퀴논 계 항생제 검출 기술이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

4. 결 론

카본 페이스트 전극에서 네모파 흡착 벗김 전압전류법을 이용하여 플루오로퀴논 계 항생제 (ENR, NOR, CIP,

OFL, LEV)를 매우 낮은 농도까지 검출이 가능하다. 또한 항생제의 종류와 관계없이 항생제의 총량을 측정함으로써 항생제의 종류와 종류별 농도에 대한 정보는 부재하더라도 그 총량을 규제할 수 있는 빠르고 정확하게 분석할 수 있음을 보였다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 것임 (109146-03-1-SB030). 이 논문은 2006년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임 (KRF-2006-353-C00024). 이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음 (KRF-2005-075-C00021).

참고문헌

1. K. Drlica and X. Zhao, 'DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones' *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **61**, 377 (1997).
2. G. J. Heo, K. S. Shin, and M. H. Lee, 'Diseases of Aquaculture Animals and Prevention of Drug Residues' *Kor. J. Food. Hygiene.*, **7**, 7 (1992).
3. M. K. Hassouan, O. Ballesteros, J. Taoufik, J. L. Vilchez, M. Cabrera-Aguilera, and A. Navalon, 'Multiresidue Determination of Quinolone Antibacterials in Eggs of Laying Hens by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection' *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **852**, 625 (2007).
4. Z. Zeng, A. Dong, G. Yang, Z. Chen, and X. Huang, 'Simultaneous Determination of Nine Fluoroquinolones in Egg White and Egg Yolk by Liquid Chromatography with Fluorescence Detection' *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **821**, 202 (2005).
5. C. M. Karbiwnyk, L. E. Carr, S. B. Turnipseed, W. C. Andersen, and K. E. Miller, 'Determination of Quinolone Residues in Shrimp using Liquid Chromatography with Fluorescence Detection and Residue Confirmation by Mass Spectrometry' *Anal. Chim. Acta*, **596**, 257(2007).
6. M. J. Schneider, A. M. Darwish, and D. W. Freeman, 'Simultaneous Multiresidue Determination of Tetracyclines and Fluoroquinolones in Catfish Muscle using High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection' *Anal. Chim. Acta*, **586**, 269 (2007).
7. B. Roudaut and J. C. Yorke, 'High-Performance Liquid Chromatographic Methode with Fluorescence Detection for the Screening and Quantification of Oxolinic Acid, Flumequine and Sarafloxacin in Fish' *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, **780**, 481 (2002).
8. N. Gorla, E. Chiostri, L. Ugnia, A. Weyers, N. Giacomelli, R. Davicino, and H. G. Ovando, 'HPLC Residues of Enrofloxacin and Ciprofloxacin in Eggs of Laying Hens' *Int. J. Antimicrob. Agents*, **8**, 253 (1997).
9. V. Hormaza'bal and M. Yndestad, 'Rapid Assay for Monitoring Residues of Enrofloxacin in Milk and Meat Tissues by HPLC' *J. Liquid Chromatogr.*, **17**, 3775 (1994).
10. D. C. Johnson, S. G. Weber, A. M. Bond, R. M. Wightman, R. E. Shoup, and I. S. Krull, 'Electroanalytical voltammetry in flowing solutions' *Anal. Chim. Acta*, **180**, 187 (1986).
11. M. Ghoneim, A. Radi, and A. M. Beltagi, 'Determination of Norfloxacin by Square-wave Adsorptive Voltammetry on a Glassy Carbon Electrode' *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **25**, 205 (2001).
12. A. Radi and Z. El-Sherif, 'Determination of Levofloxacin in Human Urine by Adsorptive Square-wave Anodic Stripping Voltammetry on a Glassy Carbon Electrode' *Talanta*, **58**, 319 (2002).
13. S. Zhang and S. Wei, 'Electrochemical Determination of Ciprofloxacin Based on the Enhancement Effect of Sodium Dodecyl Benzene Sulfonate' *Bull. Korean Chem. Soc.*, **28**, 543 (2007).