

Sulfamethazine 및 Trimethoprim 이 原乳의 TTC 檢査에 미치는 影響에 관한 研究

金 榮 秀, 黃 來 洪

서울特別市保健環境研究院 試驗科

A Study on Effect of Sulfamethazine and Trimethoprim on T.T.C. (2,3,5-Triphenyl Tetrazolium Chloride) Test in Raw milk

Young-Soo Kim, Lae-Hwong Hwang

Seoul Metropolitan Government Institute of Health and Environment, Experimental Division

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of sulfamethazine and trimethoprim on TTC test in raw milk.

Ten raw milks which does not contain any antibiotics were collected from milk farms and one hundred twenty raw milks which collected from three raw milk receiving stations and those milk samples were mixed up sulfamethazine and trimethoprim for TTC test.

The results were as follows:

1. Positive reactions of TTC test were shown above the concentration of 3,000ppm for sulfamethazine and 10ppm for trimethoprim.
2. When the TTC test was conducted with trimethoprim and sulfamethazine mixture, a pair of the concentration of trimethoprim and sulfamethazine shown to positive reaction were 0.1-2,000ppm, 0.5-1,000ppm, 1.0-250ppm and 2.0-100ppm, respectively.
3. Of 120 raw milk samples tested, 16 samples(13%) were shown quasi-positive reaction when the trimethoprim at the concetration of 2ppm was added in the samples.

Keywords : Sulfamethazine, trimethoprim, TTC test.

序 論

消費量도 급격한 伸長을 보여서 市乳의 處理量
만 볼때 81년에 341,336M /T이던 것이 84년에
최근 국민소득 향상과 함께 우리나라 乳製品 558,396M /T, 87년에 1,064, 850M /T로 3배가

넘는 증가를 보여주고 있으며¹⁾ 이러한 量的增加에 隨伴하여 발생하는 모든 문제들 특히 酪農家에서 乳房炎治療, 飼料添加 또는 感染豫防을 위해 사용하는 설과제의 우유내 殘留는 公衆保健上 중요한 문제로 擡頭되고 있다.²⁾

抗生劑나 合成抗菌劑의 사용을 規制하고 있는 미국의 경우 F.D.A.에 의하면 10개도시의 限定된 조사에서 採取原乳의 50% 이상이 測定 가능한 정도의 설과제 殘留를 나타냈다는 보고가 있으며²⁾ 국내에서도 動物藥品중에 설과제가 큰비중을 차지하는 化學療法劑의 사용량이 증가하고 있는 趨勢여서^{3,4)} 원유에 대한 설과제 殘留可能性도 점차 높아 질것으로 사료된다.

설과제는 가축에 治療學的으로 중요한 抗菌劑이지만 人體에 耐性菌誘發 등을 일으킬 수 있으며⁵⁻¹¹⁾ 소의 子宮내 投入하였을 경우 투여후 48시간 까지 우유중에 殘留되었다는 보고가 있어서¹²⁾ 우유의 衛生的인 生産供給의 중요성을 쉽게 짐작할 수 있을 것으로 사료된다.

畜產物 중에서도 우유에 대하여는 原乳檢查段階에서 細菌發育抑制物質檢查(T.T.C. 환원 시험)¹³⁾를 이용 0.002 u/ml의 페니실린 등 미량의 細菌發育抑制物質까지 檢出할 수 있어서 국내에서도 公定法으로 採擇하고 있으며¹⁴⁾ 우유위생에 많은 도움을 주고 있으나 설과제 등의 合成抗菌劑에 대해서는 感受성이 떨어지는 短點이 있다.¹⁵⁾

한편 설과제는 트리메토프림과 함께 適用時 相乘效果를 보이는데 이는 설과제가 PABA (Paraaminobenzoic acid)의 競爭的 拮抗劑로서 菌이 葉酸의 合成에 PABA를 利用하는 것을 방해하고 트리메토프림이 還元酵素인 dihydrofolate reductase를 選擇的으로 抑制함

으로써 菌이 葉酸을 合成해가는 過程에서 連續的 遮斷(Sequential Block)이 일어나기 때문이다.

¹⁶⁾

현재 畜產食品 및 飼料중의 설과제 分析方法은 개스크로마토그래프(GC)²⁾, 고속액체크로마토그래프(HPLC)¹⁷⁾, 박층크로마토그래프(TLC)^{18,19)}, Bratton Marshal 비색법^{20,21)}, MS system²⁾ 등이 있으나 일시에 多數의 試料를 檢査해야 하는 原乳의 特性에 附合하지 못하는 短點이 있어 이와같은 方法들을 應用하고 研究하여 설과제를 신속히 檢出할 수 있는 簡易方法을 摸索해야 할 것으로 思料된다.

이에 本 研究은 家畜에 사용하고 있는 설과제 중 慢性乳房炎 등의 治療에 사용되고 있는 설과메타진의¹⁵⁾ T.T.C. 還元試驗에 대한 反應程度를 확인하고 트리메토프림과의 相乘作用을 이용하여 T.T.C. 還元試驗에서의 설과제 反應을 增加시켜 檢出可能 濃度를 調査함으로써 迅速 簡易法 開發의 基礎資料를 提供하고자 試驗한 結果이다.

材料 및 方法

供試材料 : 서울시 官內에 所在하는 5개 牧場에서 최소한 7일이내에 어떠한 藥劑도 사용하지 않은 健康한 10두의 젖소를 選定하여 TTC test 결과 陰性으로 判定된 原乳 각 500ml와 官內 3개 集乳場에 納乳되는 120개 牧場에서 無作爲로 採取한 原乳 각 500ml를 Ice Box로 實驗室 운반후 4°C 냉장고에 5시간 보관하고 82°C 恒溫水槽에서 2분 30초간 殺菌후 37°C로 냉각시켜 실험에 供하였으며^{22,23)} 使用藥제로는 설과메타진과 트리메토프림 표준품(SIGMA)을 최

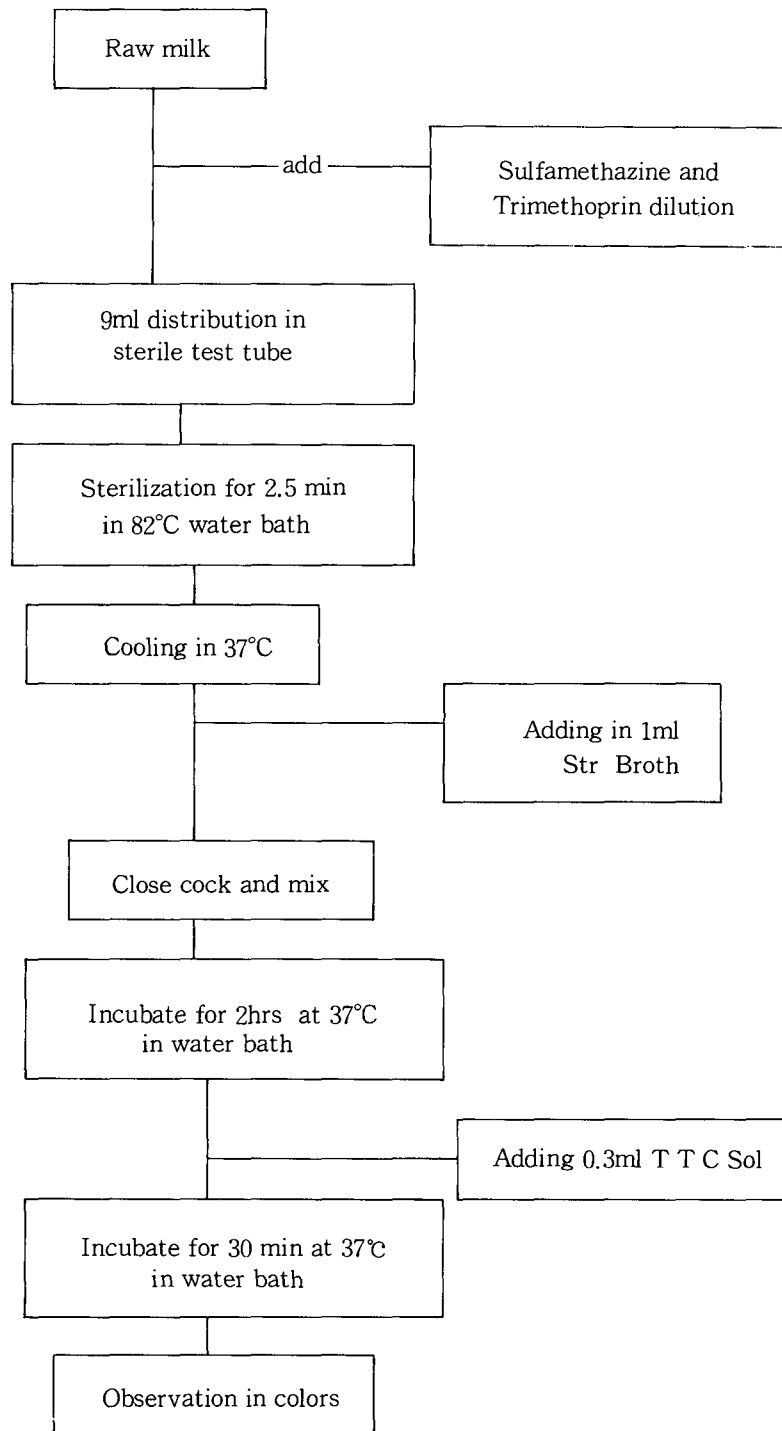


Figure. 1 Process diagram of TTC test in raw milk

소량의 10% NaOH로 녹인후 滅菌蒸溜水로 稀釋하여²⁴⁾ 實驗에 供하였다.

試驗方法 : 본 시험은 農林水産部 告示 제 85-48호(85. 9. 21) 畜産物 試驗方法중 乳의 試驗法¹³⁾을 적용하여 다음과 같이 구분 실시 하였다.

1) 健康한 젖소로 부터 搾乳한 原乳에 설파메타진을 100, 200, 400, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000 및 5000 ppm 濃度가 되게 稀釋하여 9ml를 取하고 같은 방법으로 트리메토프림을 0.1, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0 및 20.0 ppm 濃度가 되게 稀釋하여 9ml를 取하였으며

2) 同一한 原乳에 설파메타진과 트리메토프림을 각 濃度別로 混合 稀釋하여 9ml가 되게 取하였다.

3) 無作爲로 採取한 原乳에 대하여는 트리메

토프림을 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0 ppm 濃度가 되게 稀釋하여 9ml가 되게 取하였다.

上記 試料에 대하여 각 시험관에 試驗菌液 (Streptococcus thermophilus) 1ml를 가하여 37°C 恒溫水槽에서 2시간 培養후 T.T.C.용액 0.3ml를 加하여 다시 37°C 恒溫水槽에서 30분 간 培養하였다.

시험균 增殖에 의해 T.T.C.가 Triphenyl Formazan으로 還元되면서 赤色으로 發色 되는데 이 發色되는 程度를 比較하여 陽性, 疑陽性, 陰性으로 判定하였다.

結果 및 考察

健康한 젖소로 부터 搾乳한 原乳에 설파메타진과 트리메토프림을 各各 濃度別로 試驗한 結果는 다음과 같다(표 1).

Table 1. Results for the TTC test by sulfamethazine and trimethoprim concentration

Sulfamethazine												
Conc. (ppm)	100	200	400	800	1,000	1,500	2,000	2,500	3,000	3,500	4,000	5,000
Results	-	-	-	-	+-	+-	+-	+-	+	+	+	+
Trimethoprim												
Conc. (ppm)	0.1	0.5	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0	7.5	10.0	12.5	15.0	20.0
Result	-	-	-	-	-	-	+-	+-	+	+	+	+

* - : Negative +- : Quasi-positive + : Positive

설파메타진을 濃度別로 시험한 結果 3000ppm 이상에서 陽性으로 調査되었으며 1000ppm~2500ppm에서 疑陽性으로 조사된바 陽性으로 조사된 3000ppm 이상의 濃度와의 範

圍가 너무 넓게 나타나 疑陽性과 陽性의 限界를 명확히 구분 하기에는 다소 어려움이 있었으나 반복시험의 結果로 구분하였다.

설파메타진이 3000ppm 이상에서 陽性으로

조사된 것은 정¹¹의 3850±100ppm과는 차이를 보였는데 이는 본 시험의 대상시료가 원유인 반면 정¹¹의 실험은 脫脂乳(skim milk)인 점이 다르나 그 차이가 對象 試料이 다르기 때문인지는 確認할 수 없었다.

한편 트리메토프림은 10ppm 이상에서 陽性으로 조사된 바 설파메타진과 비교시 St. ther-

mophilus에 대한 感受性에 큰 差異가 있음을 보여주었으며 설파메타진은 본 시험균에 대한 感受性이 매우 弱해서 T.T.C. 還元試驗을 適用하기가 어려움을 확인할 수 있었다.

健康한 젖소로 부터 搾乳한 原乳에 설파메타진과 트리메토프림을 各 混合하여 試驗한 結果는 다음과 같다(그림 2).

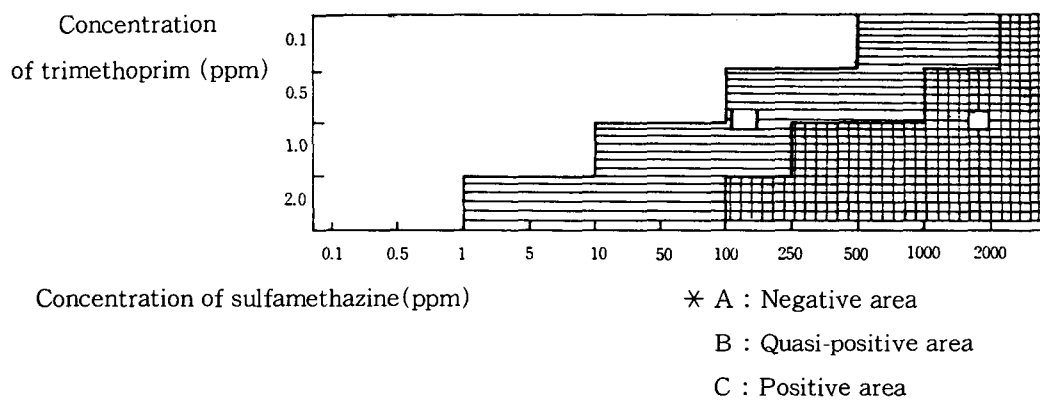


Fig.2 TTC test reaction area by the concentration of sulfamethazine and trimethoprim mixture

트리메토프림 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0ppm의 각 濃度에 대해 설파메타진은 2000, 1000, 250, 100ppm 濃度에서 각각 陽性으로 조사되어서 트리메토프림에 의한 相乘效果를 알수 있었으며 트리메토프림이 0.1ppm에서 1.0ppm으로 增加할때 설파메타진은 2000ppm에서 250ppm으로 1750ppm이나 減少했으나 트리메토프림이 1.0ppm에서 2.0ppm으로 增加할 때는 설파메타진이 250ppm에서 100ppm으로 150ppm이 減少하여 트리메토프림의 濃度가 增加함에 따라 설파메타진 濃度의 減少하는 範圍가 줄어들음을 알 수 있었다.

또한 트리메토프림 2.0ppm 濃度에서는 설파

메타진 1.0ppm의 濃度에도 疑陽性을 보여서 T.C. Test시 설파제 반응을 誘導하여 1ppm 이상의 설파메타진 또는 그 농도에 相應하는 다른 어떤種類의 설파제가 疑陽性이나 陽性으로 判定 可能하여 HPLC 등에 의해 설파제 殘留與否를 確認할 수 있을 것으로 思料된다.

Mandell과 Sande¹⁶⁾는 最適의 相乘效果를 위한 두 약제간의 最適濃度比가 있으며 설파메타사졸과 트리메토프림의 경우 20:1이었다고 한다.

그러나 본 試驗은 트리메토프림이 T.T.C. 還元試驗에는 影響을 주지않는 範圍 즉 5ppm이하에서 설파제 反應을 誘導하기 위해 실시 되었

음으로 最適效果를 위한 意味가 없는 것으로 사
료되고 任意로 가한 트리메토프림의 농도가
5ppm에 가까워 지면 트리메토프림 自體의 濃
도에 의한 疑陽性的 可能性을 排除할 수 없으며
또한 너무 적은량의 트리메토프림을 加할시
는 설과메타진의 濃도가 상당히 높아야 陽性으로
나타날 수 있음으로 2.0ppm이 가장 適한 濃
度라고 思料된다.

抗生劑나 抗菌劑가 들어있지 않은 健康한 糞
소로 부터 搾乳한 原乳에 설과메타진과 트리메
토프림을 任意로 加한 TTC Test에서 確認된
反應濃度を 利用하여 集乳場에서 無作爲로 採

取한 120건의 原乳에 트리메토프림 0.1, 0.5,
0 및 2.0ppm을 각각 加한 相乘效果를 誘導한
試驗結果 0.1, 0.5 및 1.0ppm을 加한 것 에 全部
陰性으로 나타났으나 2.0ppm을 加한 것에는 16
건의 試料에서 疑陽性을 나타냈다(표 2).

따라서 트리메토프림 1.0ppm濃度 以下에서
는 陰性으로 나타나고 2.0ppm濃度에서는 疑陽
性으로 調査되었음은 無作爲로 採取한 原乳에
1.0ppm~10.0ppm濃度の 설과메타진 또는 그
濃度の 反應性에 相應하는 다른 種類의 설과제
가 殘留하는 것으로 推定된다.

Tabel 2. Results for the TTC test reaction on the various concentration of trimethoprim in
random sampling of raw milk

Concentration (ppm)	Number of examination	Positive	Quasi-Positive	Negative	Rate of reaction (%)
0.1	120	0	0	120	0
0.5	120	0	0	120	0
1.0	120	0	0	120	0
2.0	120	0	16	104	13

한편 국내에서 飼育하고 있는 糞소의 40% 이
상이 臨床型 혹은 準臨床型 乳房炎에 感染되어
있어서 抗菌性 物質의 사용이 不可避하다는 사
실²⁵⁾을 勘案할때 合成抗菌劑의 사용도 증가할
것으로 思料된다.

따라서 集乳場 水準에서 迅速 正確하게 설과
제를 檢出할 수 있는 簡易 檢査方法의 開發이
時急한 實情이며 본 調査研究에서는 트리메토프

림의 相乘作用을 利用한 TTC還元試驗으로
簡易方法으로서의 有用性을 立證하고자 하였으
나 檢査 試料件數가 充分하지 못하여 統計上의
未洽한 점과 疑陽性으로 判定된 試料에 대하여
HPLC 등에 의한 確認試驗을 거쳐 檢證하는 등
未備한 部分을 補完 한다면 국내산 原乳중의 설
과제 殘留檢査에 대한 問題는 解決할 수 있을
것이며 이에 따른 研究調査가 持續되어 보다 效

果的인 方法을 摸索해야 할 것으로 思料된다.

結 論

설파메타진 및 트리메토프림 이 原乳의 T.T.C. Test에 미치는 影響에 대한 試驗結果는 다음과 같다.

1. 설파메타진은 T.T.C. Test 결과 3000ppm 이상의 濃度에서 陽性으로 조사 되었다.
2. 트리메토프림과 설파메타진을 混合 稀釋 시 트리메토프림 0.1ppm 농도일때 설파메타진은 2000ppm 이상의 濃度에서 陽性이었고 트리메토프림 0.5ppm 濃度일때 설파메타진은 1000ppm 이상의 濃度에서 陽性이었다. 트리메토프림 1.0ppm 濃度일때 설파메타진은 250ppm 이상의 濃度에서 陽性이었으며 트리메토프림 2.0ppm 濃度일때 설파메타진은 100ppm 이상에서 陽性을 나타냈다.
3. 任意 採取한 120건의 原乳에 트리메토프림 0.1, 0.5, 1.0 및 2.0ppm의 濃度로 각각 稀釋하여 T.T.C. Test를 실시한 結果 1.0ppm 이하의 濃度에서는 全部가 陰性으로 나타났으며 2.0ppm의 濃度에서는 16건 (13%)이 疑陽性으로 調査되었다.

參考文獻

1. 정일승. 1989. 설폰아미드제제가 TTC test 에 미치는 影響에 관한연구, 건국대학교 대학원 수의학과 석사논문.
2. Deborah E. Dixon-Holland and Stanley Katz. 1989. Direct Competitive Enzyme-

Linked Immunosorbent Assay for sulfamethazine Residues in milk. j Assoc Off Anal Chem. 72:447~.

3. 한국동물약품협회. 1984. 동물약품생산판매통계. 7~9.
4. 한국동물약품공업협동조합. 1987. 동물약품등 생산판매실적. 19~20.
5. Barnett H L. 1943. The use of sulfapyrazine in infants and children. Am J Med Sci, 599.
6. Goodman L S. and Gilman A. 1980. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 16th. Macmillan Pub Co., N Y.
7. Messersmith R E. et al. 1968. V B, 38:253~.
8. Stowe CM. 1965. Veterinary Pharmacology and therapeutics. Iowa State Pub.:408~502.
9. John D. Weber and Michael D. Smedley. 1989. Liquid chromatographic Determination of Sulfamethazine in milk. J Assoc off Anal Chem. 72:445.
10. 김영철, 이용욱. 1990. 일부지역 돼지장기 및 근육내 잔류설파메타진에 대한 조사연구. K J Food Hygiene. 5.
11. Stanley E. Charm,, Ehezer Zomer and Robert Salter. 1988. Confirmation of widespread sulfonamide Contamination in Northeast U.S Market milk. J of food protection 51.
12. Seguin BE. Morrow DA, Oxender WD. 1974. Intrauterine therapy in the cow. JAVMA:164~.

13. 농림수산부. 1985. 축산물시험방법. 농수산부고시 제85-48호. 135.
14. 박종명, 손성완, 조태형 등. 1990. 국내산돈육 및 계육중의 항생물질 잔류조사. 한국수의 공중보건학회지 27:61~
15. 박병옥, 백미순, 권기호 등. 1991. 원유중의 잔류항생물질 및 설파제조사. 한국가축위생학회지 14:64~.
16. Gerald L. Mandell and Merle A. Sande. 1980. Sulfonamides, Trimethoprim-sulfamethozazole, and agents for Urinary Tract Infections. The pharmacological Basis of Therapeutics. 16th Macmillan Pub, 10, N Y : 1095~1105.
17. Cox BL and Krzeminski LF. 1982. High performance liquid chromatographic determination of Sulfamethazine in pork tissue, JAOAC 65:1311~1315.
18. USDA-FSIS. 1987. Swine urine screen sulfa-on-site test kit, the scientific basis on SOS. Environmental Diagnostics. Inc 4.
19. Sigel CW, Wolley JI and Nichol CA. 1975. specific TLC tissue residue determination of sulfadiazine following fluorescamine derivatization. J Pharm Sci 64:973~976.
20. Bratton AC, Marshall EK. 1939. A new coupling component for sulfonamide determination. J of Bio Chem. 128:537~550.
21. Selzer GB and Banes D. 1963. The detection and Estimation of sulfonamide residues in milk. J of the AOAC 46:703~707.
22. LISKA BJ. 1960. A direct microscopic method for detecting antibiotic activity in milk. J of milk and food technology 23:117~121.
23. AGAL(NSW):Antibiotics in milk and milk products. AGAL-microbiological methods. Australia(1987)
24. 국립보건원. 1985. 병원미생물검사기준. 55.
25. 이문한, 심영화, 정재하등. 1990. 우유중에 잔류하는 sulfamethazine의 Fluorescamine을 사용한 간이검사 및 HPLC정량법. Scientific program of The 5th Annual convention of Korean Society of Food Hygiene.