

## HPLC를 이용한 돈육 중의 Oxytetracycline, Chloramphenicol 및 Sulfamethoxazole의 동시검출

조혜연\* · 조진국 · 이치호

전국대학교 축산가공학과, \*한국식품개발연구원

## The Simultaneous Analysis of Oxytetracycline, Chloramphenicol and Sulfamethoxazole in Pork by HPLC

H. Y. Jo\* · J. K. Cho and C. H. Lee

Dept. of Animal Products Science, Konkuk University, Seoul, Korea

\*Korea Food Research Institute

### Abstract

The extraction procedure and HPLC condition were modified to analyze the residues of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol in pork, simultaneously. The antibacterial agents in pork were extracted with 0.02M EDTA-McIlivine buffer:ethanol:acetonitrile (5:3:2). After the removal of fat with n-hexane, the extracts were evaporated and purified with Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge column using 0.01M oxalic acid 0.1% (v/v) triethylamine (TEA) in acetonitrile. The peak of antibacterial agents was detected with  $\mu$  Bondapak C18 column, UV detector (280 nm) and 0.01M oxalic acid: methanol: acetonitrile (7.5:2.0:0.5). Detection limits for three antibacterial standards were 0.03 ppm. Calibration curves were linear between 0.03 and 2.0 ppm ( $R^2 > 0.999$ ). When spiked the level of 1.0 ppm of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol into meats, the recoveries from meats were 77.3%, 79.7% and 59.3%, respectively.

These results showed that the modified extraction method provided good analytical resolution and the recoveries of the above antibacterial agents in meats.

Key words : HPLC, oxytetracycline, sulfamethoxazole, chloramphenicol, pork.

### 서 론

Penicillin이 1929년에 발견된 이래 여러 항생제의 개발과 더불어 임상적 이용과 축산업을 비롯한 양식업과 농업에 이르기까지 그 이용이 급증해 왔다. 현재, 가축의 대량화와 산업화를 위해 질병 예방과 치료 및 성장 촉진을 위해 각종 항균성 물질을 사료나 약제 등에 이용하고 있다. 그러나 가축에 이들이 일정량 이상 투여되거나 휴약 기간을 엄수하지 않는 등의 부주의로 식육내 잔류되어 인간에게 여러 위해를 초래할 수 있다.

Corresponding author: Chi Ho Lee, Dept. of Animal Products Science, Konkuk University, Seoul 143-130, Korea.

대표적으로 가축 및 양식업계에서 사용하고 있는 sulfonamide계열 및 tetracycline(TCs)계열의 항균성물질과 chloramphenicol(CAP) 등은 육조직 내에 잔류되어 문제시 될 수 있다.

그 중 sulfonamide는 1935년 Domagk가 발견한 이래 5000여종의 유도체가 합성되고 있으며, 30여종 정도가 현재 사용되고 있다<sup>(1)</sup>. sulfonamide계열의 항균제는 약제의 성질상 안정성이 높고 가축에 경구투여시 흡수는 빠른 반면 배설시간이 오래 걸려 체내 모든 조직과 체액 및 우유, 계란으로 이행된다<sup>(1-3)</sup>. 잔류된 sulfonamide는 조혈기능장애, 신장과 요도장애, 갑상선 기능이상 및 관절염 등의 원인이 될 수 있는 것으로 알려져 있다<sup>(1,4)</sup>. 따라서 FDA 규정(Code of Federal Regulation)에 의해 휴약기간을 약물의 종류, 투여경로, 대상동물에 따라 5~28일로 정하고 있으며, 비가열식 최대

잔류허용량은 0~0.1ppm으로 규정하고 있다<sup>(2,5)</sup>.

Chloramphenicol(CAP)은 1947년에 발견되었으며 그 항균영역이 그람양성균 및 음성균의 광범위한 영역에 이르며, rickettsia 및 다른 형태의 박테리아까지도 포함하여 우수성을 인정받았으나 재생불량성 빈혈(aplastic anemia)을 야기하는 등 생명을 위협할 정도의 독성을 갖고 있어<sup>(6,7)</sup>, 특수한 경우 외에는 사용하지 못하도록 하고 있다. 국내의 경우 식품공전에서 그 잔류 허용량을 0 ppm으로 지정하고 있다<sup>(8)</sup>.

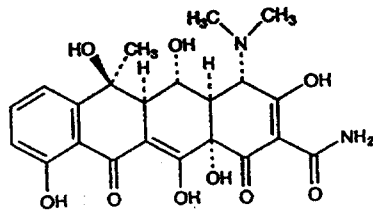
또한 1947년에는 TCs의 일종인 chlortetracycline이 발견되어, CAP에 이어 비교적 적은 독성을 갖는 주요 광범위 항균성 물질로서 전세계적으로 사용되었다<sup>(9)</sup>. 특히 TCs는 임상에서 주로 장내 병원성세균 감염증, 호흡기질병 및 원충성 질환 치료에 유효한 것으로 밝혀졌다<sup>(10-12)</sup>. 수의 공중보건학적인 측면에서 이 계열의 약제가 잔류된 축산물을 허용기준치 이상

반복 섭취시 간지방증(steatosis)을 야기할 수 있다는 보고가 있었다<sup>(10,11)</sup>. 국내에서는 식육의 휴약 기간을 종에 따라 1~10일로 권장하고 있으며<sup>(13)</sup>, 식품공전에서 TCs의 최대잔류허용량을 0.1~0.25ppm으로 지정하고 있다<sup>(8)</sup>.

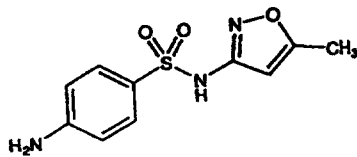
이들 항균성물질의 잔류량을 검출하기 위해 bioassay법, 효소면역측정법, TLC법, HPLC법, GC법 및 GC/MS법을 비롯한 다양한 방법이 연구되었다<sup>(10,11,14-17)</sup>. 특히, HPLC를 이용한 분석법은 비교적 정확하고 간편하여 어·육류 및 유란제품으로부터의 CAP, sulfonamides 및 TCs 등의 단일물질이, 혹은 해당계열의 여러 물질을 HPLC로 고감도로 검출한 여러 연구가 이루어졌다<sup>(6,7,18-26)</sup>. 그러나 이들 세 계열간의 항균제를 단일한 추출 및 검출 조건으로 분석한 연구보고는 없었다.

본 연구에서는 Fig. 1에 나타낸 oxytetracycline(OTC)과 sulfonamide계열의 sulfamethoxazole(SMX) 및 CAP를 돈육으로부터 단일한 추출과정을 거쳐 HPLC로 신속하게 동시검출할 수 있는 방법을 개발하고자 행하였다.

(i)



(ii)



(iii)

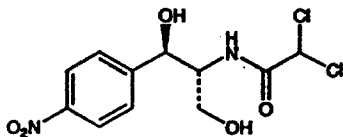


Fig. 1. Structures of three antibiotics.

(i) OTC : oxytetracycline, (ii) SMX : sulfamethoxazole, (iii) CAP : chloramphenicol

## 재료 및 방법

### 재 료

공시재료는 시중에서 구입한 돈육을 sample mill (Tecator Co. 스웨덴)로 세질하여 -72°C에서 보관한 후, 4°C에서 해동하고 5g을 취하여 사용하였다. Oxytetracycline는 Acro사(미국), 그리고 sulfamethoxazole 및 chloramphenicol은 Sigma사(미국)로부터 구입하여 0.01M potassium phosphate용액에 1,000ppm농도로 희석하고 냉암소(4°C)에 보관하여 사용하였다. 모든 시약은 분석용급을 사용하였다.

항균제의 검출파장 결정을 위한 Scanning 세 항균제의 최종분석에 적합한 최적의 HPLC 검출 파장(nm)을 조사하기 위하여 OTC, SMC 및 CAP를 100ppm의 농도가 되도록 0.01M potassium phosphate용액에 다시 희석하여 UV/vis spectrophotometer로 200~400 nm 범위에서 scanning하였다.

### 항균제의 추출

Tyczkowska 등<sup>(7)</sup>과 Horii 등<sup>(19)</sup>의 방법을 변

형하여 돈육으로부터 OTC, SMX 및 CAP를 추출하였다. 세절된 육 5g을 원심분리용기에 취하여 30ml의 0.02M EDTA 2Na-McIlvaine buffer-EtOH-acetonitrile(5:3:2)을 넣고 1분간 vortex로 강하게 2회 교반한 후 centrikon T-124(Kontron ins.)으로 6,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상층액을 100ml 용기에 옮겨 *n*-hexane 15 ml를 첨가하고 액체-액체 분별법으로 지방층을 3회 반복하여 제거하였다. 추출용 buffer층을 250ml 등근 수기에 옮기고 1%(w/v) trichloroacetic acid (TCA)와 *n*-propanol 18ml 씩을 등근 수기에 첨가했다. 추출액을 42°C에서 약 1~2ml가 될 때까지 rotary evaporator(Eyela, 일본)로 진공 농축하여 1% TCA 20ml를 더하고 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge에 통과시켰다. 1% TCA 10ml로 등근 수기를 2회 반복 세척하여 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge를 통과시킨 후, 11ml의 0.01M Oxalic-0.1% TEA-acetonitrile 용액으로 용출하였다.

용출된 액은 다시 VS-15CFV 원심분리기(Vision Sci. 한국)로 10,000 rpm으로 2분간 원심분리하고 상층액을 42°C에서 2ml로 진공농축한 후, 재원심분리하여 상층액을 함께 진공농축하였다. 0.01M potassium phosphate용액을 5ml 첨가하여 혼합하여, 0.45 μm filter(Millipore, 미국)로 여과한 후 HPLC에 20 μl 주입하여 분석하였다.

#### HPLC에 의한 항균제 검출

Sokol 등<sup>(21)</sup>의 연구에서 사용한 HPLC의 이동상 조건을 0.01M oxalic acid, methanol, acetonitrile을 7.5:2.0:0.5의 비율로 조정하였다. HPLC는 injection volume을 20 μl로 시료를 주입한 후, Waters 510 pump(Waters, 미국)를 사용하여 μ Bondapak C<sub>18</sub> (3.9×300 mm) column을 30°C로 유지하며 Isocratic system(유속:1ml/min)으로 행하였고, peak의 검출은 UV detector 486(Waters, 미국)을 이용하여 280nm에서 측정하였다. data는 3회 반복 실험한 결과를 SAS system<sup>(27)</sup>을 이용하여 단 순회기 방법으로 분석하였다.

#### 결과 및 고찰

항균제의 검출파장 결정을 위한 Scanning

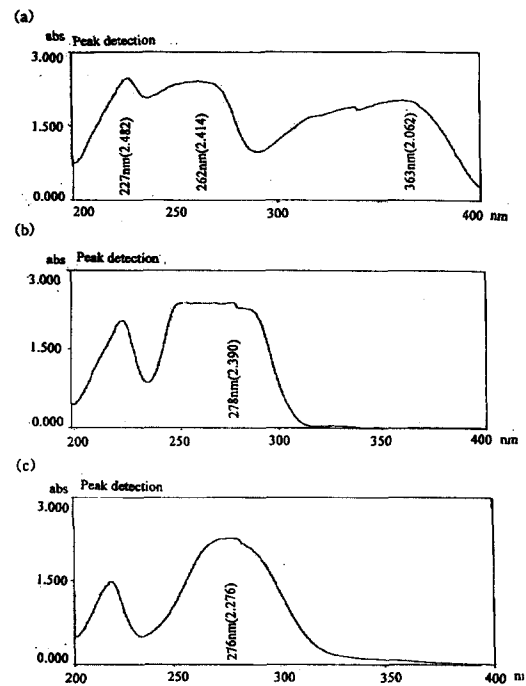


Fig. 2. UV spectra of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol. (a) Oxytetracycline (100 ppm):  $\lambda$  max = 227, 262, 363 nm, (b) Sulfamethoxazole (100 ppm):  $\lambda$  max = 278 nm, (c) Chloramphenicol (100 ppm):  $\lambda$  max = 276 nm.

HPLC로 분석할 세 항균제의 검출파장을 결정하기 위하여 OTC, SMX 및 CAP를 100ppm 농도가 되도록 조정하여 UV/vis spectrophotometer로 200~400nm범위에서 scanning하여 각각의 최적파장을 조사하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 각각 OTC는 227, 262 및 363nm, SMX는 278nm, CAP는 276nm에서 각각 최대 흡광도값을 나타내었다. 250~290nm 범위내에서 공통적으로 높은 흡광도를 나타내었으므로, 280nm에서 비교적 안정한 chromatogram을 얻을 수 있어 HPLC의 UV/vis detector 검출을 위한 파장으로 결정하였다.

표준물질 OTC, SMX 및 CAP를 0.01M potassium phosphate 용액에 2.0 ppm이하의 농도로 희석한 다음, 결정된 HPLC 검출조건을 이용하여 각 농도별 흡광도치를 측정하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 표준 검량곡선을 작성한 결과  $R^2 > 0.999$ 의 양호한 직선관계를 나타

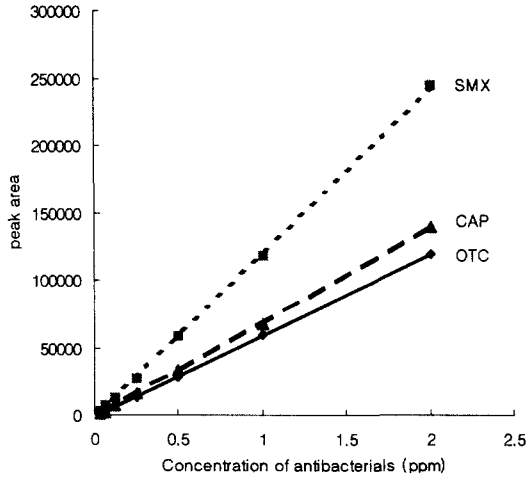


Fig. 3. Standard curves between peak area and concentration of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol by high performance liquid chromatography. The curves were composed with the residual concentration between 0.03~2.0 ppm in 0.01 M potassium dihydrogen phosphate solution. OTC: oxytetracycline ( $R^2 = 0.9997$ ), SMX: sulfamethoxazole ( $R^2 = 0.9997$ ), CAP: chloramphenicol ( $R^2 = 0.9999$ ).

내었으며 검출한계는 0.03 ppm이었다.

항균제의 추출과 HPLC에 의한 검출

세 항균제는 Fig. 1에서와 같이 구조 및 성질이 다르므로, 단일 조건으로 이들 모두를 육으로부터 추출하기 위한 단계적 검정이 필요하였다. 각각의 항균제 표준물질을 이용하여 Sep-pak C18 cartridge column에 의한 분리, 추출 결과를 Fig. 4에 나타냈다. 0.1% TEA-acetonitrile(용매 A)로 용출할 경우 OTC가 23.2%로 극히 낮은 추출율을 보였다(Fig. 4. A). OTC를 검출하기 위해 0.01M methanolic-oxalic acid를 이용한 연구<sup>(10,21~24)</sup>가 있었으므로, 0.01M oxalic acid-0.1% TEA-acetonitrile(용매 B)로 용출하였다. 그 결과 OTC의 추출율은 97.4%로 개선되었고(Fig. 4. B), 이후의 회수율 실험에서는 용매 B(11ml)를 사용하였다.

돈육에 각 항균제를 1.0ppm (1µg/g of pork)농도로 침투시키고 추출용매를 바꾸어 최종 회수율을 측정된 결과를 Table 1에 나타냈다. Tyczkowska 등<sup>(7)</sup>과 Horii 등<sup>(19)</sup>의 방법

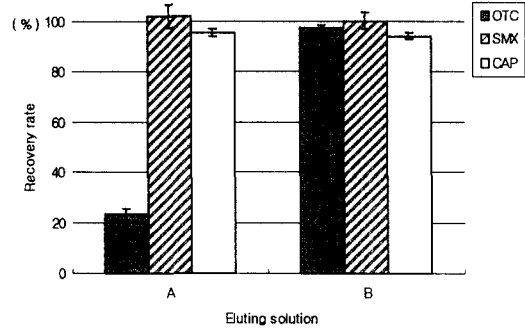


Fig. 4. Eluting solution through Sep-pak C18 and recovery rates of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol. Each value presents means of recovery rates, and bar shows standard deviation (n=3). OTC, SMX and CAP mean oxytetracycline, sulfamethoxazole, and chloramphenicol. A panel shows the recovery rate of eluted antibacterials with 10 ml 0.1% (v/v) triethylamine in acetonitrile, B panel means recovery rate of eluted antibacterials with 10 ml 0.1% (v/v) triethylamine in acetonitrile containing 0.01M oxalic acid.

을 적용하여 water : EtOH : acetonitrile의 5 : 3 : 2 구성비의 추출액으로 추출한 결과, 세 항균제를 임의로 주입한 돈육에서 OTC가 15.1%로 극히 낮은 회수율을 나타내었다. 이는 TCs의 항균제가 단백질과 결합하고 금속이온과 착화합물을 형성하기 때문인 것으로 사료된다<sup>(21)</sup>. 따라서 이 계열의 항균제를 효과적으로 추출하기 위해서 2Na-EDTA를 사용한 연구보고를 참조하여<sup>(10,21~26)</sup> 추출용매를 0.02M 2Na-EDTA, Mcilvine buffer로 대체한 결과, CAP는 59.3%로 최근 분석법에서 알려진 회수율들(60%~100%)보다는 다소 감소한 회수율을 보였으나 OTC와 SMX는 각각 77.3%와 79.7%의 회수율을 얻었다. 이 결과는 기존의 연구결과, 즉 0.1 ppm의 OTC를 spike한 bovine과 porcine에서 70%<sup>(26)</sup>, 0.5 ppm의 SMX이 spike된 돼지로부터 94.1%<sup>(20)</sup>, CAP는 10µg/kg 수준에서 55.1%가 회수되었다는 결과<sup>(6)</sup>와 비교할 때 상당히 회수율이 향상된 것으로 나타났다.

세 항균제를 HPLC에 의해 분석하였을 때 나타난 peak의 chromatogram은 Fig. 5에 나타

Table 1. Extracting buffer and recovery rates of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol in pork at the level of 1.0 ppm

Extracting buffer	Recovery rate (%)		
	OTC <sup>a)</sup>	SMX	CAP
D:E:A <sup>b)</sup>	15.1 ± 1.2 <sup>c)</sup>	65.5 ± 2.0	67.2 ± 2.8
0.02M:E:A	77.3 ± 6.2	79.7 ± 7.8	59.3 ± 3.1

<sup>a)</sup>OTC: oxytetracycline, SMX: sulfamethoxazole, CAP: chloramphenicol

<sup>b)</sup>The recovery rates of antibacterials extracted with (D:E:A) DDW:EtOH:acetonitrile (5:3:2), and (0.02M:E:A) 0.02M EDTA 2Na-McIlvaine buffer:EtOH:acetonitrile (5:3:2)

<sup>c)</sup>Mean ± standard deviation of recovery rates (n=3)

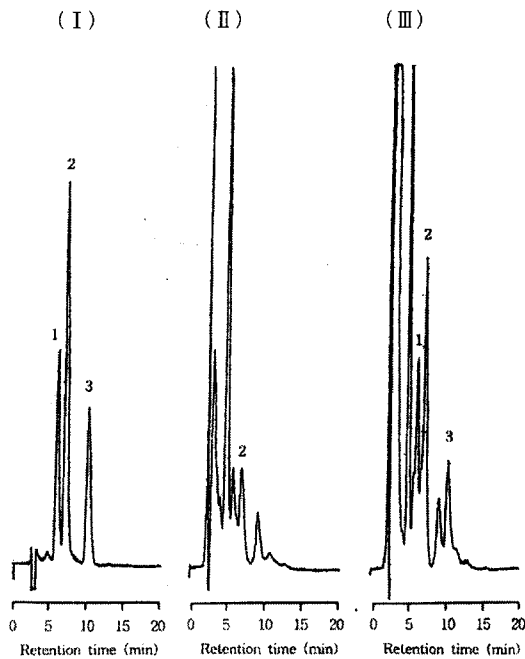


Fig. 5. Chromatogram from blank pork sample and spiked pork samples with 1.0 ppm of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol. (I). Standard chromatogram of oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol at the level of 1.0 ppm, (II). chromatogram of blank pork sample, (III). chromatogram of spiked pork sample at the level of 1.0 ppm.

1 : oxytetracycline, 2 : sulfamethoxazole, 3 : chloramphenicol.

내었다. 회수를 검정시 공실험 돈육의 잔류 SMX

의 면적값은 제하여 계산하였다.

본 검출법의 적용성을 시험하기 위하여 시중에 유통되고 있는 돈육을 무작위로 구입하여 OTC, SMX 및 CAP의 실제 잔류량을 측정하여 Table 2에 나타냈다. 식품공전<sup>(8)</sup>에서 OTC는 0.1ppm, CAP는 불검출로 그 허용치를 지정하고 있는데, 9개의 돈육시료에서 OTC는 2건에서, CAP는 1건에서 각각 허용치 이상으로 잔류한 것으로 나타났다.

이상의 결과로부터 기존에 HPLC를 이용하여 동일계열의 유도체들의 동시분석한 방법<sup>(10,19~21,23,26)</sup>을 각기 다른 계열의 OTC, SMX 및 CAP 검출에 적용시킨 결과, 본 검출법은 비교적 양호한 검출한계를 가지며 회수율이 증가된 면에서 효율적인 것으로 나타났다. 따라서 본 연구결과는 서로 다른 계열의 항균제인 OTC, SMX 및 CAP를 동시에 분석하기 위한 추출조건을 개선하여 비교적 효과적으로 검출할 수 있는 방법을 확립한데 의의가 있으며, 이를 뒷받침하기 위하여 세 항균제의 peak를 GC/MS 등으로 동정하고 돈육시료의 수를 늘려 측정하여 통계적 신뢰도를 부여할 필요가 있다고 사료된다.

## 요 약

본 연구에서 돈육으로부터 각기 다른 세 계열의 항균물질인 OTC, SMX 및 CAP를 단일한 추출, 정제과정을 거쳐 HPLC로의 동시검출을 위한 조건을 결정하였다. OTC, SMX 및 CAP의 HPLC 동시검출 조건은 UV/vis spectrophotometer로 scanning한 결과를 참조하여

**Table 2. Concentration of the residual oxytetracycline, sulfamethoxazole and chloramphenicol contents in commercial pork**

Sample (n=3)	Concentration of antibacterial residues (ppm)		
	OTC <sup>1)</sup>	SMX	CAP
Pork back			
#1	n.d.	0.31±0.04	n.d.
#2	n.d.	0.14±0.03	n.d.
#3	0.26±0.10	0.25±0.05	n.d.
#4	n.d.	0.15±0.06	n.d.
#5	n.d.	0.17±0.02	n.d.
ribs			
#1	0.25±0.03	0.18±0.03	n.d.
#2	n.d.	0.14±0.00	0.39±0.16
#3	0.01±0.02	0.09±0.01	n.d.
#4	n.d.	0.43±0.06	n.d.

<sup>1)</sup>OTC: oxytetracycline, SMX: sulfamethoxazole, CAP: chloramphenicol

<sup>2)</sup>Name of samples

<sup>3)</sup>n.d.: not detected concentration of antibacterial residues (< 0.004)

<sup>4)</sup>Mean ± standard deviation of the concentration of antibacterial residues (n=3)

검출파장을 280 nm로 결정하였으며, 이동상으로 0.01M oxalic acid-MeOH-acetonitrile (7.5:2:0.5)을 사용하였다. 결정된 검출조건에서 각 항균제 표준물질의 검출한계는 0.03ppm이었으며, R<sup>2</sup>>0.999의 양호한 직선성을 나타내었다. 0.01M oxalic acid를 포함하는 0.1% (v/v) triethylamine acetonitrile를 사용하여 Sep-pak C<sub>18</sub> cartridge으로 항균제를 추출할 경우 94~100%가 효과적으로 추출되었다. 또, 추출액 0.02M 2Na-EDTA, Mcilvine buffer: EtOH:acetonitrile(5:3:2)를 사용한 결과 육내의 OTC, SMX 및 CAP는 77.3%, 79.7% 및 59.3%로 회수되었다. 그리고, 유통되고 있는 9개의 돈육시료를 무작위로 선택하여 본 검출법으로 실제 이들 항균제의 잔류량을 측정하였을 때, OTC, CAP가 각각 2건, 1건에서 허용치 이상 잔류한 것을 확인하였다.

이상의 결과로부터 본 검출법은 서로 다른 계열의 항균제인 OTC, SMX 및 CAP를 동시에 비교적 효과적으로 검출할 수 있는 것으로

나타났다.

### 감사의 글

이 논문은 1998년도 건국대학교 동물자원연구센터의 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

1. Park, J. T., Jeong, E. J., Kim, Y. G., Song, B. J., Oh, K. S., Lim, H. C. and Kim, S. C.: Survey on the sulfonamide residues in beef, pork and chicken. *Korea J. Food Sci. Technol.*, 26, 221 (1994).
2. 농업공무원교육원: 수의반 교재, 235 (1990).
3. Epstein, R. L. and Ashworth, R. B.: Tissue sulfonamide concentration and correlation in turkeys. *Am. J. Vet. Res.*, 50, 926 (1989).
4. 박종태, 정은주, 김영국, 송병준, 오금순, 임현철, 김순천: HPLC법에 의한 식육중의 설파제 잔류량 조사. 한국축산식품학회지, 26, 221 (1994).
5. 박찬구, 이창업, 이문한, 이영재: 돈육에 잔류하는 sulfamethazine 정량법의 비교연구. 서울대학교 수의대 논문집, 15, 33 (1991).
6. Aerts, R. L., Keukens, H. J. and Werdmuller, G. A.: Liquid chromatographic determination of chloramphenicol residues in meat, interlaboratory study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 72, 570 (1989).
7. Tyczkowska, K., Hedeem, K. M., Aucoin, D. P. and Aronson, A. L.: Simple LC method for determination of chloramphenicol in Equine, Canine, and Feline serum. *J. Chromatographic Sci.*, 26, 533 (1989).
8. 식품공전. 한국식품공업협회, 35 (1995).
9. Huber, W. G.: Nicholas, H. B. and Mcdonald, L. E. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 6ed, Ed, Iowa State University Press. 813 (1988).
10. 박재명, 최해연, 이은정, 조우영, 조부제, 정운선: 식육중 테트라사이클린 계 항생물질 잔류조사. *Korean. J. Vet. Serv.*, 221 (19-

- 97).
11. 박종명, 신진호, 이광직: 동물약품구급정보 전산화 연구. 농촌진흥청 가축위생연구소 시험연구보고서: 36 (1990).
  12. Nicholas, H. B. and McDonald, L. E.: Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 5ed. Iowa State University Press. 740 (1985).
  13. 농림수산부. 동물의약품의 안전 사용기준. 농림수산부 고시 제 1995-85호 (1995).
  14. 박종명: 축산식품 잔류물질 검사법. 도서출판 상록, 66 (1991).
  15. Dixson, D. E. and Katz, S. E.: Competitive direct Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of sulfamethazine residues in swine urine and muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 71, 1137 (1998).
  16. Michel, M.: Analysis of antibiotics by gas chromatography II. Chloramphenicol, *J. Chromatography*, 47, 341 (1970).
  17. Carignan and Carrier: Quantitation and Confirmation of Sulfamethazine Residues in Swine Muscle and Liver by LC and GC/MS, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 74, 479 (1991).
  18. Keukens, H. J., Beek, W. M. J. and Aerts, M.M.L.: High-performance liquid chromatographic screening and confirmation methods for chloramphenicol residues in meat with off-line cartridge sample clean-up and on-line diode array UV-VIS detection. *J. Chromatography*, 352, 445 (1986).
  19. Horii, S., Momma, C., Miyahara, K., Maruyama, T. and Matsumoto, M.: Liquid chromatographic determination of three sulfonamides in animal tissue and egg, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 73, 990 (1990).
  20. Ikai, Y., Oka, H., Kawamura, N., Hayakawa, J. and Yamada, M.: Improvement of chemical analysis of antibiotics, X V II. Application of an amino cartridge to the determination of residual sulphonamide antibacterials in meat, fish and egg. *J. Chromatography*, 541, 393 (1991).
  21. Sokol, J. and Marisova, E.: Determination of tetracycline antibiotics in animal tissues of food-producing animals by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatography*, 669, 75 (1994).
  22. Diaz, T. G., Cabanillas, A. G. and Salinas, F.: Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography. *Analytical Letters*, 23, 607 (1990).
  23. Oka, H., Matsumoto, H. and Uno, K.: Improvement of chemical analysis of antibiotics, VIII. Application of prepacked C<sub>18</sub> Cartridge for the analysis of tetracycline residues in animal liver. *J. Chromatography*, 325, 265 (1985).
  24. Pouliquen, H., Keita, D. and Pinault, L.: Determination of Oxytetracycline in marine shellfish (*Crassostrea gigas*, *Ruditapes lippinarum* and *Scrobicularia plana*) by high-performance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatography*, 627, 287 (1992).
  25. Barnes, W. N., Ray, A. and Bates, L. J.: Reversed-phase high-performance liquid chromatographic method for the assay of oxytetracycline. *J. Chromatography*, 347, 173 (1985).
  26. Walsh, J. R., Walker, L. V. and Webber, J. J.: Determination tetracyclines in bovine and porcine muscle by highperformance liquid chromatography using solid-phase extraction. *J. Chromatography*, 596, 211 (1992).
  27. SAS User's Guide : Statistics. SAS Inst., Cary, NC. (1986).

---

(2001년 1월 29일 접수)