

HPLC를 이용한 식육내 타이로신의 잔류분석법

김곤섭 · 신선혜 · 김종수 · 라도경
경상대학교 수의과대학 (동물의학연구소)
(2001년 2월 8일 게재승인)

Determination of tylosin in edible meats by high-performance liquid chromatography

Gon-sup Kim, Sun-hye Shin, Jong-su Kim, Do-kyung Ra

College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Science, Gyeongsang National University
(Accepted by February 8, 2001)

Abstract : A simple and rapid analytical method for the determination of tylosin in chicken, pork and muscle was established by High-Performance Liquid Chromatography(HPLC). Chicken, pork and beef muscle(5 g) were fortified by adding the 0.2 µg/ml of standard tylosin and the drug was extracted from meats with 70% acetonitrile(ACN) and followed by liquid-liquid partition for clean-up procedure. Then 20 µl portion of ACN elution was directly analyzed by HPLC with spectra 100 variable wavelength detector, and unfortified blank control were treated similarly. The average recovery rate of tylosin added to chicken, pork and beef muscle were 83± 2.3, 96± 3.3 and 92± 1.6(%) at the level 0.2 ppm, respectively. No tylosin residues in marketing meats. These results suggested that HPLC methodology could be acceptable for the extraction, determination and screening of tylosin residues in edible meats.

Key words : tylosin, muscle, HPLC, 70% ACN

서 론

식생활 수준의 향상으로 축산물의 소비가 지속적으로 증가됨에 따라 축산물의 생산성 향상, 가축의 질병예방과 치료를 목적으로 다량의 항균성물질(항생물질 및 합성 항균제)이 이용되고 있다^{1,2)}. 이러한 항균성 물질들은 가축의 체내에 잔류하여 이를 소비하는 사람들의 건강을 위협하므로 이들 사용을 엄격히 규제하고 있지만 최근에는 각종 질병이 복합적으로 발생하고 신종 질병들이 발생함에 따라 각종 항균제의 사용량이 증가추세에 있어 그 잔류 규제가 시행되고 있다.

Tylosin은 *Streptomyces fradiae*에서 추출한 polypeptide 항생물질로서 16개환의 lactone 구조^{16,27)}를 모핵으로 하는 macrolide 계 항생물질이다. Tylosin은 *mycoplasma*와 *chlamydia*와 같은 그람 양성균에 대하여 강한 항균력을 나타내지만 그람 음성균에 대한 항균력은 제한적이다. 특히, *mycoplasma*에 대한 항균력은 macrolide 계 항생물

질 중 가장 우수하다^{5,32)}.

또한 조직 이행성 및 지속성도 우수하기 때문에 성장 촉진을 위한 사료 첨가제 뿐 아니라 치료제로서 가장 많이 사용되고 있는 약제 중의 하나이다^{3,31)}.

Tylosin의 사용은 식육 내에 잔류할 수 있고 이런 약제 잔류는 인체 내 알레르기 반응과 같은 부작용이나 또는 약제내성을 일으킬 수 있다^{6,10)}. Tylosin 내성균은 macrolide 계 항생물질인 erythromycin과 교차내성을 보여 사람의 호흡기 감염시 치료제로 사용되는 중요한 macrolide 계 항생물질인 erythromycin에 약제내성반응을 보임으로써 사람의 질병치료를 어렵게 한다.

Tylosin은 지속성이 우수하여⁴⁾ 가축의 조직에 오랫동안 잔류하여 이를 소비하는 사람의 건강을 위협하므로 우리 나라를 비롯한 선진국에서는 도축전 안전 휴약기간 및 식육내 최대 잔류 허용량을 설정해 놓고 있다. 또한 약제의 종류에 따라서 축산식품용 가축에는 사용을 금지하는 것도 있고 약물의 종류, 투여경로 및 대상

Address reprint requests to Dr. Gon-sup Kim, College of Veterinary Medicine and Institute of Animal Science, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

동물에 따라서 안전 휴약 기간을 달리 정하고 있다^{2,20)}. European union(EU)에서는 tylosin의 maximum residue limits(MRLs)를 g 당 0.1 µg으로 정하고 있었으나^{19,25)} 1999년 1월 1일 이후로 가축의 성장촉진용으로 사용되는 항생물질에 내성을 획득한 가축의 세균이 인체에 기생하는 세균에게 그 약제내성을 전달하여 인체용으로 사용되는 관련 약물들에 대하여 약제내성을 일으켜 사람에서의 질병 치료를 어렵게 함으로서 인체의 건강을 해할 우려가 있다는 전제하에 tylosin의 사용을 금지하였다.

Tylosin의 지속성 우수로 축산물 내에 잔류가 염려되기 때문에 tylosin 분석법들이 개발되어 졌는데 tylosin 검사법으로는 생물학적 검사법(Bioassay method)⁷⁾, Moats 등²¹⁾이 개발한 Liquid Chromatography(LC) 법, Majer 등^{22,29)}이 개발한 Thin Layer Chromatography(TLC) 법, Delepine 등^{10,24,26)}이 개발한 Liquid Chromatography-Mass Spectrometry(LC-MS) 법, 그리고 Liguoro 등¹¹⁾이 개발한 HPLC 법 등이 있다. 현재 국내에서는 식육내 tylosin 잔류 허용 한계치를 0.2 ppm으로 고시하여 생물학적 검사법으로 분석하고 있으나 이 방법은 기기 분석법에 비해 검사 정확도가 낮고, 검출 한계치가 낮아 MRLs를 검출하는데 어려움이 있고, 또한 이 방법은 시험균의 계대 보존과 배지 조제가 복잡하고, 결과관정에 장시간을 필요로 하는 등 시료를 신속하게 처리하는데 어려움이 있으며, LC 및 TLC 법은 tylosin을 분석하는데 한계가 있으며 LC-MS, HPLC 법은 여러 단계의 복잡한 전처리과정, 많은 유기용매 사용, 많은 시간이 낭비되며 검출율과 회수율이 낮아 tylosin을 검출하는데 어려움이 있으므로 보다 신속하고 정확한 잔류분석법의 확립이 요구되어진다. 따라서 본 연구는 식육내 tylosin의 보다 신속하고 정확한 분석법을 확립하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

공시재료

도축장에서 임의로 채취한 쇠고기 45 예, 돼지고기 70 예와 국내 수입 쇠고기(23 예), 돼지고기(37 예), 닭고기(20 예)를 -20°C 상태로 보관하면서 tylosin 잔류 실험에 이용하였다.

시약 및 재료

본 실험에 사용한 표준 tylosin은 Sigma(USA) 사의 제품인 tylosin tartrate(Sigma, MO 63178, USA)를 사용하였고, 그 화학적 구조는 Fig 1과 같다. Acetonitrile(ACN)과 methylene chloride는 모두 특급 HPLC 용을 사용하였으며 18.3 MΩ(Milli-Q-system)의 3차 증류수를 사용하

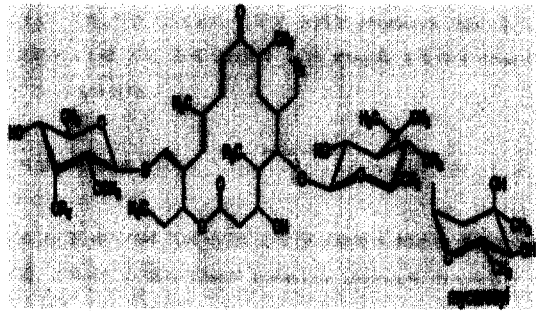


Fig 1. Chemical structures of tylosin.

였다.

Phosphoric acid, K_2HPO_4 와 KH_2PO_4 는 모두 Sigma 제품을 사용하였고, C_{18} cartridge(Lichrosorb RP-18(40-63 mesh))를 사용하여 정제하였다.

장치 및 측정조건

본 실험에 사용한 HPLC 장치는 모두 Spectra physics사의 제품으로 검출과장 280 nm, 감도 0.0005 AUFS로 설정하여 Nova-pak C_{18} column (3.9 mm×150 mm., ID)으로 분석하였고, 이동상으로는 phosphoric acid buffer와 ACN을 7:3으로 조제하여 유량 1.0 ml/min으로 흘리면서 분석하였다.

표준 tylosin 용액 제조

Tylosin 표준품 12.7 mg을 정량하여 100 ml 증류수로 용해하여 ml 당 100 µg의 농도로 보존하면서 이 용액을 ml 당 10 µg의 농도로 희석하여 사용하였으며 사용농도는 필요에 따라 적절히 조정하여 사용하였다.

이동상 용매(Mobile Phase) 제조

HPLC 분석을 위한 tylosin의 이동상 용매는 phosphoric acid 용액 2.45 ml을 증류수 1 l에 가한 용액 700 ml와 ACN 300 ml을 혼합하여 0.5 µm 필터로 여과한 후 사용하였다.

시험용액 조제

시료 5 g을 채취하여 70% ACN 50로 균질화하여 10 분간 원심분리한 후 상층액을 분액여두로 옮겨 50 ml의 methylene chloride와 진탕하였다. 분리된 하층액을 받아 감압 농축 건조시켜 0.2M potassium phosphate buffer (pH 7) 5 ml을 가해 vortex mixer로 건조된 잔류물을 녹였다. C_{18} cartridge를 각 단계마다 건조되지 않도록 하여 ACN 10 ml, 증류수 10 ml로 활성화시킨 후, 미리 준비된 시료를 통과시키고 증류수 10 ml로 column을 세척

한 후 10 ml ACN으로 용출하여 이 용액을 nitrogen gas로 건조시켜 이동상 용매 1 ml로 용해한 후 Nova-pak C₁₈ column에 20 μ l 주입하여 280 nm, 유속 1.0 ml/min의 조건으로 실온에서 분석하였다.

첨가 회수 실험

예비실험에서 tylosin이 함유되어 있지 않은 것으로 판정된 시료 5 g에 tylosin 표준용액을 0.2 ppm의 농도로 첨가하고 전처리 한 후 HPLC column에 20 μ l씩 주입한 후 분석된 tylosin의 크로마토그램의 피크면적에 의해 회수율을 구하였다.

Bioassay method

식육내 잔류 tylosin의 검출을 위하여 항생물질의 미생물 성장 억제력을 이용하여 잔류량을 측정하는 생물학적 검사법(bioassay method)⁷⁾을 이용하였고, 시험균으로는 tylosin에 높은 감수성을 보이는 *micrococcus luteus* ATCC 9341a를 이용하여 시험 균액 및 검사용 평판배지를 조제한 후, 스크리닝 검사법에 따라 처리하였으며, 시료 10 g을 채취하여 0.2M potassium phosphate buffer(pH 8)로 균질화한 후 45분 이상 실온에 두어 추출하여 200 μ l를 spider에 접종하고 30°C에서 18-24시간 배양하여 Zone reading device로 억제환을 측정하였다. 대조군으로는 예비실험에서 tylosin이 잔류되지 않은 식육에 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 그리고 3.2 μ g/ml의 농도로 첨가하여 상기 방법에 의해 측정하였다.

검량선 작성

표준 tylosin 용액의 농도를 각각 0.5, 0.75, 1.0 그리고 1.25 μ g/ml 되도록 하여 이동상 용매로 희석하여 이 표준 용액을 HPLC column에 20 μ l 주입하여 얻은 피크면적을 Y 축, 농도를 X 축으로 하여 tylosin의 표준 곡선을 작성하여 회수율과 잔류량을 정량하는데 이용하였다.

잔류조사

본 실험법을 이용하여 도축장에서 임의로 채취한 시료(돈육 70 예, 우육 45 예)와 1998년 5~10월간의 국내 수입육(돈육 37 예, 우육 23 예 그리고 계육 20 예)을 분석하였다.

결 과

HPLC 분석을 위한 표준곡선 작성

표준 tylosin의 농도 0.1, 0.15, 0.25 그리고 0.3 ppm에 대한 HPLC 분석을 실시하여 얻은 피크 면적을 Y 축으로, 농도를 X 축으로 산정한 회귀방정식에서 상관계수

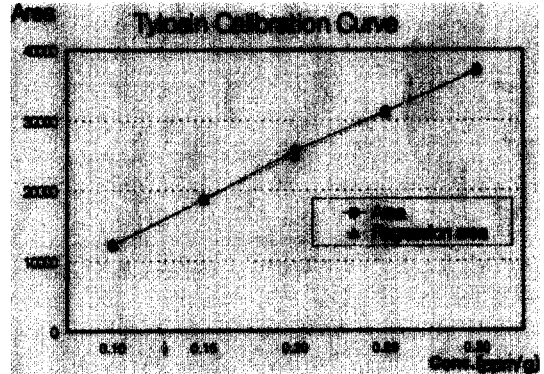


Fig 2. Tylosin standard calibration curve.

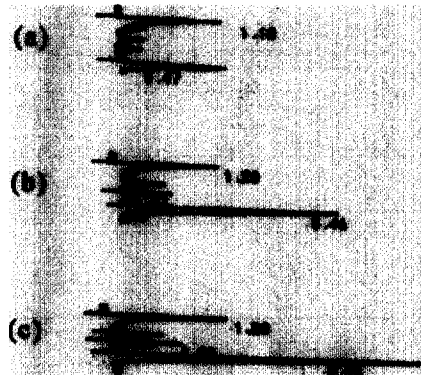


Fig 3. Chromatogram of tylosin standard (a: 0.1, b: 0.2 and c: 0.3 ppm/g).

r 값은 0.999로 유의 상관을 보이는 직선을 나타내어 이 표준 곡선을 식육내 잔류하는 tylosin의 양 및 회수율 산정에 이용하였다(Fig 2).

Fig 3은 농도별에 따른 표준 tylosin의 크로마토그램으로써 전형적인 크로마토그램은 양호하였으며 10분 이내에 분석할 수 있었다.

HPLC에 의한 tylosin의 회수율

Tylosin 용액 0.2 μ g/ml 씩을 첨가한 식육에서의 회수율을 조사한 결과 크로마토그램상은 Fig 4와 같이 분리능이 우수하였고, 그 결과는 Table 1과 같이 평균 회수율이 각각 96%, 92% 그리고 83%로 높은 회수율을 나타내었다. 이 결과에서 돈육, 우육에서는 높은 회수율을 나타내었고 계육에서는 비교적 낮은 회수율을 나타내었으나 인정 회수율 70~120(%내)에 인정되므로 계육에서도 적절한 방법이라 사료되며, 검출 한계치는 0.1 ppm으로 나타났고 농도별에 따른 유의성은 없었다.

회수율을 높이기 위하여 전처리 과정에서 추출 용매

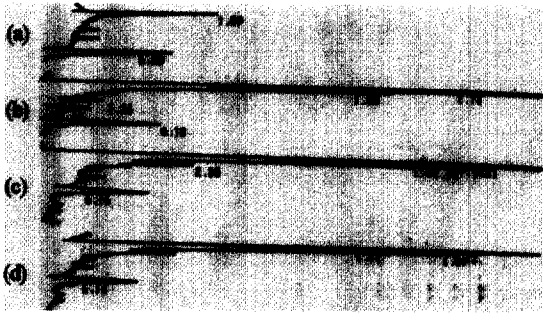


Fig 4. Chromatogram of tylosin standard (a) and from fortified pork(0.2 ppm) (b), beef(0.2 ppm) (c) and chicken (0.2 ppm) (d) muscle tissue.

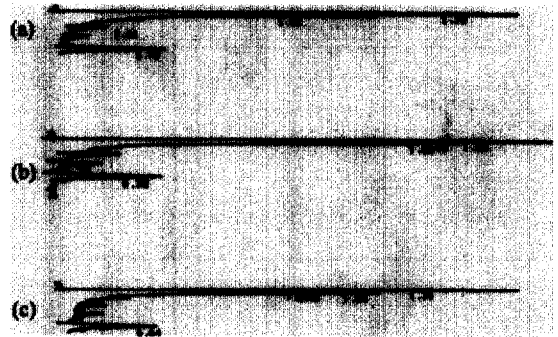


Fig 5. Typical chromatogram obtained with potassium phosphate buffer at pH4 (a), pH7 (b), pH9 (c).

Table 1. Recovery rate of tylosin from fortified chicken, pork and beef muscle tissue

Fortified Level (ppm)	Recovery (%)		
	pork ⁿ⁼³⁷ (mean±SD)	beef ⁿ⁼³³ (mean±SD)	chicken ⁿ⁼²⁵ (mean±SD)
0.10	96±3.8	91±1.9	83±1.8
0.15	93±1.8	94±2.4	85±2.2
0.20	96±3.3	92±1.6	83±2.3
0.25	93±1.5	92±1.3	87±3.2
0.30	91±1.8	89±2.1	82±1.5

n : Number of replicates
SD : Standard deviation

Table 2. Recovery rate of tylosin from meats by adding ACN

ACN (%)	Recovery (%)		
	pork ⁿ⁼⁵ (mean±SD)	beef ⁿ⁼⁵ (mean±SD)	chicken ⁿ⁼⁵ (mean±SD)
50	80±3	83±2	80±2
70	96±3	92±2	83±2
90	75±3	80±1	82±1
100	81±2	79±1	78±3

n : Number of replicates
SD : Standard deviation
ACN : Acetonitrile

의 농도에 tylosin의 회수율을 조사한 결과 ACN 70%에서 회수율이 가장 높게 나타나 70% 농도의 ACN을 본 실험의 전처리 과정에 사용하였다(Table 2). 또한 pH에 따라 회수율이 영향을 받으므로 potassium phosphate buffer의 pH를 각각 4, 7 그리고 9로 조정하여 실험한 결과 Fig 5의 크로마토그램상 현저한 차이는 없었지만, 각



Fig 6. Typical chromatogram of tylosin standard (a), swine muscle fortified with 0.2 ppm of tylosin (b) and blank swine muscle (c).

각의 회수율이 83%, 95% 그리고 79%로 pH 7일 때 tylosin을 가장 많이 회수할 수 있었으므로 pH 7의 buffer를 본 실험 전처리 과정시 사용하였다.

대조군으로 tylosin이 없는 것으로 확인된 돼지고기 시료에 tylosin 0.2 ppm을 첨가한 시료와 표준 tylosin을 HPLC에 공하여 얻은 크로마토그램을 비교한 결과 retention time이 동일한 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다(Fig 6).

Bioassay 법과의 상관관계

이번에 확립한 HPLC 법의 타당성을 조사하기 위해 현재 국내에서 이용되고 있는 tylosin 분석법인 bioassay method와 본 실험법에 의한 HPLC 분석법을 비교실험하였다. Tylosin을 첨가한 시료를 이용하여 피크면적의 총합을 써서 평가한 HPLC 법에 의한 정량치와 tylosin의 시험균인 *micrococcus luteus* ATCC 9341a를 사용한 bioassay method⁷⁾에 의한 정량치와의 상관성을 검토한 결과 Fig 7에 나타난 것과 같이 상관계수 r=0.99로 높

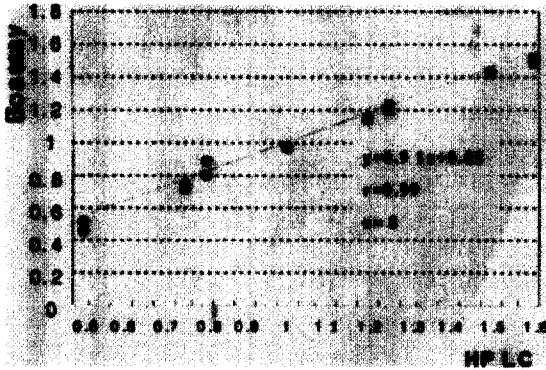


Fig 7. Correlation between HPLC and bioassay methods for tylosin in swine muscle.

은 상관성을 나타내었고, 재현성을 고려하여 각 시료마다 3회씩 측정하였다.

잔류조사

본 실험법 즉, HPLC를 이용한 tylosin 잔류 분석법을 이용하여 도축장에서 임의로 채취한 시료(돈육 70 예와 우육 45 예)와 1998년 5~10월 간의 국내 수입육(돈육(37 예), 우육(23 예) 그리고 계육(20 예))를 분석하였지만 tylosin은 어느 것에서도 검출되지 않았다.

고 찰

가축의 질병예방과 치료를 목적으로 다량의 항균성 물질(항생물질 및 합성 항균제)이 이용되면서, 축산물의 생산성 향상에 크게 기여되고 있다. 그러나 한편으로는 이들 의약품들이 축산물에 잔류하여 식품 위생상 중요한 문제로 대두되어 축산식품의 안전성을 확보하기 위한 그 잔류 규제가 시행되고 있다. 따라서 항균성 물질의 잔류 유무를 확인하는 신속하고도 높은 감도의 분석법을 필요로 하고 있다^{1,2)}.

Macrolide 계 항생물질인 tylosin은 감수성 세균에 의해 일으켜지는 여러 가지 감염증의 예방과 치료를 위해 사용되며^{3,31)} 소의 폐렴, 족 부패, 급성전염병, 자궁염, 급성 유방염, 돼지의 관절염, 폐렴, 단독, 이질 및 닭과 칠면조의 만성 호흡기 질병예방과 부비강염의 치료제로 이용될 뿐 아니라 사료효율 개선 및 성장 촉진제 등으로 광범위하게 사용되고 있다⁸⁾.

Tylosin은 조직 이행성 및 지속성도 우수하여⁴⁾ 식육내에 잔류할 수 있으며 tylosin 약제 내성균은 거의 모두 사람의 호흡기 감염시 치료제로 사용되는 중요한 macrolide 계 항생물질인 erythromycin에 내성반응을 보

인다⁶⁾. 따라서 축산물의 생산성 향상을 위하여 tylosin이 효과적으로 이용되고 있으나, tylosin에 내성을 획득한 가축의 세균이 인체에 기생하는 세균에게 그 내성을 전달하여 인체용으로 사용되는 관련 약품들에 대하여 내성을 일으켜 사람에서의 질병 치료를 어렵게 하여 인체의 건강을 해 할 우려가 있기 때문에 안전성이 확보된 축산물의 생산이 필수적이다. 안전한 축산물을 생산하기 위해서 식육내 잔류하고 있는 tylosin을 비롯한 각종 항생물질을 검출하기 위한 방법으로 LC^{21,33)}, TLC^{22,29)}, LC-MS^{23,30)}, GC-MS^{24,9-14)}, HPLC^{4,9-14)}, Bioassay^{15,16)} 등의 검출방법이 보고되어 있으나 시료의 전처리 과정에서 buffer, chloroform, methanol, acetonitrile 및 formic acid 등의 많은 용매를 사용하고, 일부 분석에서는 분석 전 acid hydrolysis와 acetylation 등¹⁰⁾ 여러 가지 단계를 거쳐야 하며, 또한 bioassay 법은 시험균의 계대보존과 배지조제가 복잡하고 결과 판정에 장시간을 필요로 하는 단점이 있다⁴⁾.

Tylosin은 지용성이 매우 높은 염기성 화합물이기 때문에 C₁₈ cartridge에 강하게 부착되어 식육 내 다량의 단백질, 지질, 아미노산 등의 교잡성분은 C₁₈ cartridge에 의한 정제법으로 교잡성분을 충분히 제거하여 tylosin만을 깨끗이 분리할 수 있었다. 염기성 물질의 수용시간은 이동상의 pH에 크게 영향을 받는다. 즉, pH가 낮을수록 용출은 빨라지고 양호한 크로마토그램을 얻을 수 있으며, 이것은 pH가 낮은 경우 아미노당이 이온성을 가지므로 이로 인하여 친수성이 증가하는 경우와 잔존하는 실라놀기의 해리가 억제되기 때문이라고 보고되어 있다^{4,17)}. Paesen 등¹⁸⁾은 tylosin의 pH 변화에 따른 영향 등을 조사하여 tylosin은 산성 조건의 pH 4~7에서 각각 시간이 지남에 따라 pH 7~pH4의 순서로 각각 감소하였고, 알칼리 조건의 pH7~10에서의 tylosin은 pH7~pH10의 순서로 각각 감소하여 tylosin은 pH 7에서 가장 안정성을 나타내었으며 분해작용에 있어서 특별한 산이나 염기의 촉매작용은 없다고 하였다. Kennedy 등⁹⁾도 tylosin은 pH 7에 안정하나 pH 4 이하나 pH 9 이상에서는 불안정하다고 하였다. 본 실험에서도 tylosin은 pH 7에서 가장 안정하고 또한 회수율도 우수한 것으로 나타나 Paesen과 Kennedy의 결과와 일치하는 경향을 나타내었다.

Chan 등³⁴⁾은 tylosin 추출과정시 100% ACN을 사용하였으나 본 실험에서는 70% ACN을 사용하여 Chan의 결과인 80±10(%) 보다 더 높은 회수율을 얻을 수 있었다.

본 실험에서 식육에 tylosin을 첨가하여 회수율을 검사하였던 바, 돈육에서 96%, 우육에서 92% 그리고 계육에서 83%의 수준으로 계육에서 낮은 수준을 보였고 돈육과 우육에서는 높은 회수율을 보였다. Horie⁴⁾ 등의

방법에 의한 회수율은 돈육, 우육 그리고 계육에서 각각 88%, 84% 그리고 88%로 계육에서 비교적 높은 반면 돈육과 우육은 본 실험결과가 우수하였고, Saito 등¹²⁾과 Liguoro 등¹¹⁾도 각각 70~90%와 70~85%로 본 실험결과가 더 우수하였다. 본 실험에서 비록 계육에서 낮은 회수율을 보였지만 회수율이 70% 이상이면 분석 시에 신뢰성을 인정할 수 있는 점²⁸⁾으로 볼 때 본 실험에서 사용된 실험기법은 돈육, 우육 그리고 계육에서 모두 tylosin의 잔류 실태조사에 적용 가능한 결과로 사료된다. 그러나 tylosin은 특히 닭의 mycoplasma³²⁾에 관한 항균력이 macrolide 계 항생물질 중 가장 뛰어난 약제며 닭에 있어서 보다 많이 이용되고 있기 때문에 계육에 있어서 잔류 tylosin을 검출하는데 낮은 회수율에 문제가 있는 바 좀 더 연구가 수행되어야 할 과제라 사료된다.

또한 HPLC 분석에 있어서 식육내 잔류하는 tylosin의 양 및 회수율의 산정에 이용할 방정식에서 상관계수 r 값이 0.999 이상으로 높은 유의성을 보여 tylosin의 잔류량을 측정하는데 신뢰성이 있는 결과를 얻을 수 있었다. Chan 등³⁴⁾도 r 값이 0.995 이상으로 높은 유의성을 보였다.

1999년 1월 1일 이후로 EU에서 가축의 성장촉진용으로 사용되는 항생물질에 내성을 획득한 가축의 세균이 인체에 기생하는 세균에게 그 내성을 전달하여 인체용으로 사용되는 관련 약품들에 대하여 내성을 일으켜 사람에서의 질병의 치료를 어렵게 함으로서 인체의 건강을 해할 우려가 있다는 이유로 tylosin의 사용을 금지하였다. 따라서 실험을 시행할 시의 국내의 tylosin의 잔류 허용치는 조직 g 당 0.2 μ g 이었기에 모든 실험의 기준은 0.2 ppm으로 행했지만 극미량의 검출을 위하여 실험을 수행하였던 바 본 실험법으로 tylosin을 분석하였을 시 MRLs 이하의 0.1 ppm 분석에서 평균 회수율 96%로 높은 회수율을 얻어 극 미량의 검출이 가능하였으며, Horie 등⁴⁾은 0.05 ppm/g 까지 분석가능하였다. 도축장에서 임의로 채취한 우육 45 예와 돈육 70 예에서 tylosin의 잔류 상태를 조사하였으나 어느 것에서도 tylosin은 검출되지 않았다.

따라서 상기의 결과를 종합하여 볼때 현재 국내에서 이용되고 있는 tylosin 검출을 위한 분석법인 HPLC 분석법은 tylosin 검출에 높은 유의성을 나타내었다. 뿐만 아니라 bioassay method는 회수율은 높았으나 분석 시간이 오래 걸리고, 검출 한계치가 낮아 최대 잔류 허용량(MRLs)을 검출할 수 없었고, 0.4 ppm 부터 검출이 가능하였다.

그러므로 본 실험기법은 회수율이 높을 뿐 아니라 적은 시약으로 짧은 시간에 분석이 가능하여 tylosin을 검출하는 신속, 정확한 분석 방법이라 사료된다.

결 론

본 연구에서는 식육중 tylosin의 분석법을 확립하기 위해 HPLC를 이용하여 시험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HPLC 분석법으로 tylosin의 회수율을 시험한 결과 최대 검출 한계치는 0.1 ppm 이었으며 회수율도 90%에 달해, 국내 잔류 허용 한계치인 0.2 ppm 이하의 농도로 검출되어 HPLC 법 적용이 가능하였다.
2. 식육 중 tylosin 0.2 ppm 농도로 첨가하여 분석한 결과 돈육에서 $96 \pm 3.3(\%)$, 우육에서 $92 \pm 1.6(\%)$ 그리고 계육에서 $83 \pm 2.3(\%)$ 의 회수율을 나타내었으며, 그 중 계육에서 다소 낮은 회수율을 보였지만 인정회수율 70~120(%) 내에 인정되므로 모두 적용 가능하였다.
3. 기존의 bioassay method과의 비교실험에서 상관계수 $r=0.999$ 로 상관성을 보여 본 HPLC 분석법의 타당성을 평가할 수 있었다.
4. Tylosin은 pH 7에서 가장 안정하고 pH 4 이하나 pH 9 이상에서는 불안정하였다.
5. 시판 중인 식육에서는 tylosin이 검출되지 않았다.

참고문헌

1. 박종명, 박근식. 축산식품의 유해물질 잔류와 그 관리 방안. 한국식품위생학회지. 6:17-22, 1991.
2. 이문한, 신광순. 동물성 식품에 대한 안전성확보의 문제점과 대책. 한국식품위생학회지. 5(3):139-158, 1991.
3. Omura S, ed. Macrolide Antibiotics: Chemistry, Biology and Practice(Orlando, FL : Academic Press). 3, 1984.
4. Horie M, Saito K, Hoshino Y, Nose N and Nakazawa H, Determination of tylosin in chicken, pork and beef by high-performance liquid chromatography. *EISEI KAGAKU*. 34(2):128-134, 1998.
5. Masakazu Horie. Chemical analysis of macrolide antibiotics. Chemical analysis for antibiotics used in agriculture. 166-205.
6. Code of Federal Regulations Title 21, Part 556, 1993.
7. 농림부 국립 동물 검역소. 식육중 잔류물질 검사지침서. 1997.
8. Nichoals H. Booth and Leslie E. McDonald, Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6th ed. Iowa State. 839-840, 1988.
9. Kennedy JH., High-performance liquid chromatographic analysis of fermentation broths: cephalosporin C and tylosin *J Chromatogr Sci*. 16:492-495.
10. Delepine B, Hurtaud D and Sanders P, Identification of tylosin in bovine muscle at the maximum residue limit level liquid chromatography-mass spectrometry, using a particle beam interface. *Analyst*. 119:2717-2721, 1994.

11. De Liguoro M, Anfossi P, Angiletti R and Monteissa C, Determination of tylosin residues in pig tissues using high-performance liquid chromatography. *Analyst Jun*, 123(6):1279-1282, 1998.
12. Horie M., Saito K, Ishii R, Yoshida T, Haramaki Y and Nakazawa H, Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A Jul 3*; 812(1-2):295-302, 1998.
13. Yeh WK, Bauer NJ and Dotzlar JE, High-performance liquid chromatographic assay for S-adenosyl-L-methionine : macrocin O-methyltransferase. *J Chromatogr*. 288:157-165, 1984.
14. Fish BJ and Carr GPR. Pharmacopoeial procedure for the determination of tylosin factors by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*. 353:39-50, 1986.
15. Association of Official Analytical Chemists, Official Methods of Analysis, 15th ed. (Arlington, VA:AOAC, 1990), sec. 988.08.
16. Ministry of Health and Welfare, Official Methods for Residual Substances in Livestock Products(Tokyo, Japan: Ministry of Health and Welfare, 1982).
17. Horie M, Saito K and Nakazawa H. Determination of kitasamycin and josamycin in meat by HPLC. *BUNSEKI KAGAKU*. 45(12):1089-1094, 1996.
18. Paesen J, Cypers W, Pauwels K and Roets EJ. Hoogmartens. Study the stability of tylosin A on aqueous solution. *J Pharm Biomed Anal*. 13:1153-1159, 1995.
19. Commission regulation(EEC) 675/92 of 18 March. off. *J Eur Communities L*:73, 8-14. 1992.
20. Booth NH, Drug and chemical residues in the edible tissues of animals veterinary pharmacology and therapeutics. 5th ed. *Iowa state*. 1065-1110, 1982.
21. Willian, A. Moats. Chromatographic methods for determination of macrolide antibiotic residues in tissues and milk food-producing animals. *J Assoc off Anal chem*. 68(5):980-984, 1985.
22. Majer J, in Antibiotics, Isolation, separation and purification, J.J. Weinstein & G. H. Wagman(Eds). *J Chromatogr Lib*. 15:273-308, 1978.
23. Roets E, Beirinckx P, Quintens I and Hoogmartens J, Quantitative analysis of tylosin by column liquid chromatography. *J Chromatogr*. 630:159-166, 1993.
24. Commission decision 93/256/EEC of 14 April 1993. Off. *J Eur Communities L*:118, 64-79, 1993.
25. FSIS Compound Evaluation and Analytical Capability Document. J. Brown(Ed.), USDA Food Safety and Inspection Service, Washington, DC. 1984.
26. Delepine B, Hurtaud-Pessel D and Sanders P, Multiresidue method for confirmation of macrolide antibiotics in bovine muscle by liquid chromatography/mass spectrometry. *J AOAC Int*. 79(2):397-404, 1996.
27. Bobillot S, Bakos T, Sarda P, Olesker A and Lukacs G, Chemical modification of tylosin. *J Antibiot(Tokyo)*. 48(7):667-670, 1995.
28. 국립보건원 : 식품 중 항생물질 분석개요. 19-41, 1994.
29. Markakis PK, Microbiological method for determining macrolides in animal feeds in the presence of other drugs by thin-layer chromatography detection, *J AOAC int*. 79(6):1263-1268, 1996.
30. Takatsuki K, Ushizawa I and Shji T, Gas chromatographic-mass spectrometric determination of macrolide antibiotics in beef and pork using single ion monitoring. *J Chromatogr*. 391(1):207-217, 1987.
31. Kavanagh F, Tylosin in feeds, in analytical microbiology. Kavanagh. F., ed. V. II. Academic Press, New York. 359-364, 1972.
32. Baba T, Yamashita N, Kodama H, Mukamoto M, Asada M, Nakamoto K, Nose Y and McGruder ED, Effect of tylosin tartrate on humoral immune responses in chickens. *Zentralbl. Veterinarmed(B)*. 45(5):279-286, 1998.
33. Houglum. JE and Tasler MK, Liquid chromatographic assay of tylosin in animal feeds. *J AOAC Int*. 79(2):369-374, 1996.
34. Chan W, Gerhardt GC and Salisbury CDC, Determination of tilmicosin and tylosin residues in tissue. *J AOAC Int*. 77:331-333, 1994.