

Macrolide계 항생물질 동시분석법 확립 및 모니터링

박상옥¹ · 이상호* · 안중훈 · 정영지 · 김성철 · 김지연 · 금은희 · 성주현 · 김상엽 · 장영미 · 강찬순
부산지방식품의약품안전청 수입식품분석과, ¹광주지방식품의약품안전청 유해물질분석과

Simultaneous Determination and Monitoring of Three Macrolide Antibiotics in Foods by HPLC

Sang-Ouk Park¹, Sang-Ho Lee*, Jong-Hoon Ahn, Young-Ji Jung, Seong-Cheol Kim, Ji-Yeon Kim, Eun-Hee Keum, Ju-Hyun Sung, Sang-Yub Kim, Young-Mi Jang, and Chan-Soon Kang

Imported Food Analysis Division, Busan Regional Korea Food and Drug Administration

¹Hazardous Substance Analysis Division, Gwangju Regional Korea Food and Drug Administration

Abstract In this study, a simple and rapid pre-treatment method based on liquid extraction was applied for the simultaneous determination of three macrolides (spiramycin, tylosin, and tilmicosin) residues. In these studies, the stock farm products was used as a matrix sample. When the liquid extraction method was compared with the solid phase extraction (SPE) method, the former showed higher recovery percentages and simpler steps than the latter. The macrolides were separated using a reverse-phase C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column and a gradient elution with mobile phases consisting of phosphate buffer (pH 2.5) and acetonitrile. Tylosin and tilmicosin were detected at 288 nm and spiramycin was detected at 232 nm. The average recovery percentage ranged between 83.0-90.2% for samples spiked with the three macrolids at 50 and 100 ng/g. The validation results showed that the limit of detection (7 (spiramycin), 12 (tilmicosin), 12 (tylosin) ng/g) was under the regulatory tolerances and the linearity from calibration curves was satisfactory for determining the multi-residue of three macrolids in farm products. Monitoring samples were collected at the main cities in Korea as Seoul, Busan, Deajeon, Incheon, Deagu, and Gwangju. Microlide antibiotics were not detected in most samples.

Key words: macrolide, veterinary drugs, food, HPLC, monitoring

서 론

거대한 지방족 lactone ring 구조를 가진 항생제를 통칭하는 macrolide계 항생물질은 항세균성 화합물로 분류되며, 의약품과 동물용 의약품으로 매우 널리 이용되고 있다(1). Macrolide계 항생물질은 크게 항세균성과 항진균성으로 분류할 수 있는데, 후자는 'polyene계' 항생물질라고 불리기도 한다. 항세균성 macrolide계는 50S ribosome과 complex를 형성함으로써 세균의 단백질 생합성을 저해하는 작용기전을 가지고 있다. 또한 Gram(+)균에 높은 활성을 가지고 있으며, *Mycoplasma* sp.에 야기되는 질병에 가장 효과가 있는 항생물질이다(2-4).

Macrolide와 같은 항생물질은 가축류와 어류의 질병 치료 목적으로 사용되어 왔으나 성장촉진을 위한 사료 첨가제로도 사용되고 있다(5). 사료 등에 포함되어 무분별하게 사용된 항생물질은 흙이나 물에 오염되고, 먹이사슬을 통하여 최종 가축이나 어류에 축적되기도 한다(6). 이렇게 과도하게 사용된 항생물질은 근육조

직, 폐, 간장과 신장에 널리 분포하게 됨과 동시에, 특히 식용부위에 존재하게 되어 소비자들이 비의도적으로 항생물질을 섭취하게 되는 경우가 발생하게 된다(7). 그리고 잔류허용기준을 초과하여 잔류하는 항생물질을 식품으로 장기간 섭취하게 되면 직접적으로는 알레르기 반응 등의 부작용을 나타낼 수 있고, 간접적으로는 내성 박테리아를 발생시키는 등 여러 가지 문제점을 발생시킨다고 한다(8,9).

이러한 문제점을 방지하기 위해 세계 여러 나라에서는 항생물질에 대한 잔류기준(MRL: maximum residue level)을 설정하고 있다(10). Macrolide계 항생물질의 경우, European Union(EU)에서는 erythromycin, spiramycin, tylosin, tilmicosin, olendomycin, josamycin에 대한 기준·규격이 축산물에 설정되어 있다. 그리고 국내에서는 축산물 중 spiramycin, tylosin, tilmicosin에 대하여 잔류허용기준을 각각 0.2, 0.2, 0.1 mg/kg으로 설정하여 관리하고 있다. Spiramycin의 수산물 중 잔류허용기준은 우리나라뿐만 아니라 일본에서도 0.2 mg/kg으로 기준·규격이 설정되어 있다. 하지만 식품 중 항생물질을 효과적으로 관리하기 위해서는 그 잔류량 분석을 위한 신속하고 정확한 시험법의 확립이 우선되어야 한다. 그러나 기준·규격이 설정된 항생물질을 검출하기 위한 분석 방법상에 어려움이 많다는 것이 전문가의 공통된 의견이다. 지금까지는 미생물을 이용한 검출방법이 널리 사용되었으나, 높은 sensitivity에 비해 specificity가 좋지 않아 잔류기준에 따른 규제를 위한 분석방법으로는 한계가 있다고 할 수 있다. 이러한 이유로 현재는 식품 중의 항생물질의 잔류량 검출을 위해 기기분석

*Corresponding author: Sang-Ho Lee, Imported Food Analysis Division, Busan Regional Korea Food and Drug Administration, Busan 608-829, Korea
Tel: 82-51-610-6241
Fax: 82-51-610-6199
E-mail: salutsh@kfda.go.kr
Received December 22, 2009; revised January 19, 2010;
accepted January 20, 2010

을 이용한 많은 방법들이 연구·개발되고 있다(4). 특히 macrolide계 항생물질은 12-원소 환에 lactone ring 구조를 가지고 있으며, 여러 위치에 methyl 또는 hydroxyl 치환기가 도입되어 있는 화학구조로 인한 물리적인 특성에 차이가 있기 때문에 동시분석방법이 거의 보고 되지 않고 있다.

따라서 본 연구에서는 축산물과 수산물에 기준·규격이 설정되어 있는 macrolide계 항생물질인 spiramycin, tylosin 및 tilmicosin을 동시에 분석하는 방법을 개발함으로써 기존 연구에서 문제되었던 상관관계(r^2), 낮은 회수율, 낮은 검출한계 등과 같은 분석방법의 유효성을 확보하려 하였다. 이를 토대로 식품에 적용할 수 있는 분석법을 확립하고 수입축산물에 대한 모니터링을 실시하여 식품안전관리의 기초 자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

분석대상인 macrolide계 항생물질(spiramycin, tylosin, tilmicosin)의 표준품은 Sigma Chemicals(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였으며 각각의 구조식은 Fig. 1과 같다. Acetonitrile 및 methanol, *n*-hexane는 Merck Inc.(Darmstadt, Germany)에서 HPLC급으로 구입하여 사용하였다. 무수황산나트륨(sodium sulfate)은 Junsei Chemical Co. Ltd.(Tokyo, Japan)로부터 시약급으로 구입하였으며, 여과지는 silicone treated filter paper(1PS)제품을 Whatman International Ltd.(Maidstone, England)으로부터 구입하여 사용하였다. 그리고 본 실험에 사용된 기타 일반시약은 특급시약을 사용하였다.

모니터링을 위하여 사용된 검체는 전국 6개 광역도시(서울, 부산, 인천, 대구, 대전, 광주)를 중심으로 원산지 표기가 명확한 수입 축산물과 이를 이용한 가공품을 수거하였다. 이들 제품은 백화점 및 할인 마트, 재래시장 등에서 구매하여 사용하였다. 수거된 검체는 즉시 분쇄, 혼합하여 균질화하였으며 분석이 되기 전까지 -20°C 냉동실에 보관하였다.

표준용액조제

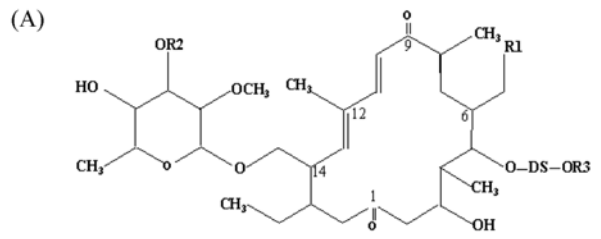
각각의 표준물질(spiramycin, tylosin, tilmicosin)을 정밀히 달아 methanol에 녹여 농도가 100 µg/g이 되도록 조제하였다. 그리고 0.05 M phosphate buffer(pH 2.5)/acetonitrile(7/3, v/v) 혼합액으로 희석하여 50, 100, 500 및 1000 ng/g이 되도록 표준용액을 만들어서 검량선을 작성하였다.

분석기기

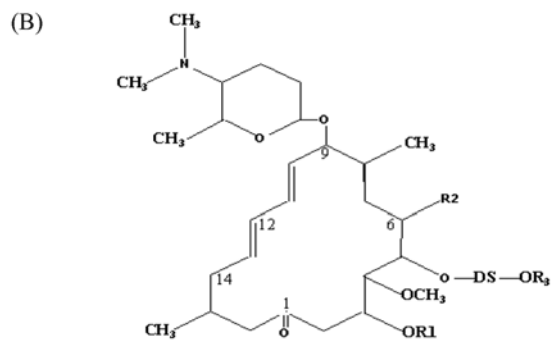
Macrolide계의 분석을 위한 고속액체크로마토그래피(HPLC: High Performance Liquid Chromatography) 및 photodiode array(PDA) 검출기는 Shiseido Nanospace SI-2(Shiseido Fine Chemicals, Tokyo, Japan)를 사용하였으며, C18 컬럼은 Capcell-Pak UG-120(Shiseido Fine Chemicals)을 사용하였다.

실험방법

시료 중 대상물질 추출: 시료 5 g을 50 mL 원심튜브에 취한 다음, acetonitrile 20 mL를 첨가하여 20분간 shaking하여 균질화시켰다. 그리고 4500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 여과하면서(1PS, Whatman International Ltd) 분액여두에 옮기고, 위의 과정을 2회 반복하였다. 그 다음 hexan포화아세트나이트릴 10 mL를 분액여두에 넣고 약하게 흔든 다음 정치시키고 acetonitrile층은 sodium sulfate에 통과시켜 증발 플라스크에 받았다. 그리고 감압 농축기를 이용하여 40°C에서 농축, 건조하였다. 건조물에 0.05 M



Compound	R1	R2	R3
Tylosin A	-CHO	-CH ₃	Mycarose
Tylosin B	-CHO	-CH ₃	
Tylosin C	-CHO	-H	Mycarose
Tylosin D	-CH ₂ OH	-CH ₃	Mycarose



Compound	R1	R2	R3
Spiramycin I	-H	-CH ₂ CHO	Mycarose
Spiramycin II	-COCH ₃	-CH ₂ CHO	Mycarose
Spiramycin III	-COCH ₂ CH ₃	-CH ₂ CHO	Mycarose
Spiramycin IV	-H	-CH ₂ CH ₂ OH	Mycarose

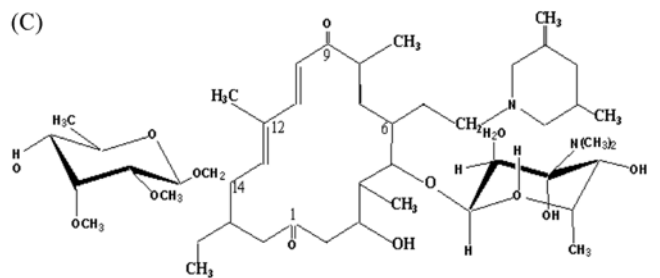


Fig. 1. The chemical structure of target compounds (A: tylosin A and related compounds, B: spiramycin I and related compounds, C: tilmicosin).

phosphate buffer(pH 2.5)/acetonitrile(7/3) 혼합액 1 mL로 잘 용해시킨 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하여 시험용액으로 사용하였다.

기기 분석: 컬럼은 C18(250 mm×4.6 mm, 5 µm)을 사용하였으며 분석대상물질의 검출을 위한 UV-wavelength 선택은 spiramycin 경우 232 nm이고, tilmicosin과 tylosin은 288 nm를 이용하였다. HPLC 이동상은 A를 0.05 M phosphate buffer(pH 2.5)로 B를 0.05 M phosphate buffer(pH 2.5)/acetonitrile(6/4, v/v)로 설정하여 분석하였다. 두 이동상을 60:40의 비율로 흘려주다가 분석이 시

Table 1. The changes on recovery percentage¹⁾ of macrolide antimicrobials with different pre-treatment methods (Unit: %)

Compounds	Solid phase extraction	Liquid-liquid partition
Tilmicosin	14.3	89.0
Tylosin	20.8	84.4
Spiramycin	28.5	83.5

¹⁾samples were spiked with level of 50 ng/g

작되면 20분까지 B 이동상을 100%까지 올린 후 5분 동안 지속 시켰다. 5분이 지나면 다시 60:40의 비율로 컬럼을 안정화시킴으로서 3종류의 macrolide계 항생물질을 분리하였다. 시료는 20 μ L 을 주입하고 컬럼의 온도는 40°C를 유지하였다.

회수율 측정: 분석방법에 따른 회수율을 측정하기 위하여 macrolide계 항생물질을 함유하지 않은 쇠고기 및 돼지고기에 표준용액을 첨가한 후, 5°C에서 하룻밤을 방치하여 대상 항생물질이 육 조직 내부로 충분히 침투할 수 있도록 하여 사용하였다. 각 대상물질의 시료 중 최종농도는 50 및 100 ng/g이 되도록 하였으며, 회수율 측정은 각각의 농도 및 시료에 대하여 3번 반복하여 평균과 상대표준편차를 계산하였다.

결과 및 고찰

Macrolide계의 분석 조건 확립

본 연구에서는 축산물 중 macrolide계 항생물질의 분석을 위해 효과적인 전처리법을 선택하기 위하여 항생물질에 일반적으로 사용되는 전처리법 중 solid phase extraction(SPE)법과 액상추출법을 적용하였을 때의 회수율을 비교하였다(Table 1). Leal 등(11)이 보고한 SPE 방법을 이용하여 회수율을 측정한 결과, matrix로부터 유래되는 간섭물질을 제거하는데 효과가 있었으나 액상 추출법에 비해 회수율이 급격히 저하됨을 알 수 있었다. 그리고 항생물질 전처리법 중 SPE 방법은 일반적인 추출법에 비해 과정이 복잡하고 시간이 장시간 소요되는 단점을 가지고 있다. 따라서 본 연구에서의 SPE법은 macrolide의 전처리법으로는 적절하지 않음을 확인할 수 있었다. 이에 반하여 액상 추출법을 사용한 전처리법은 기존의 방법에 비해 조작이 간단하고 시간도 절약되며 우유, 어류 및 갑각류 외에 축산물에도 사용할 수 있어서 동시에 다양한 식품군에서 분석할 수 있는 장점이 있으나, 항생물질 이외의 성분들이 동시에 추출되면서 분석시 baseline이 나빠지는 경향을 보이고 matrix가 복잡한 시료의 경우 방해 peak의 영향으로 분리능이 떨어지는 단점이 있음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 경우는 0.025 M phosphate buffer(pH 2.5) 및 acetonitrile을 이용한 이동상의 조성을 조절하여 matrix로부터 유래되는 방해 peak의 간섭이 없는 조건에서 분석함으로써 항생물질의 분리능을 높일 수 있었다.

Macrolide계(spiramycin, tilmicosin, tylosin) 표준용액을 HPLC로 분석한 결과는 Fig. 2에 나타난 것과 같다. 그림에서와 같이 macrolide계의 머무름 시간(t_r : retention time)은 spiramycin, tilmicosin 및 tylosin은 각각 8.5, 13.2, 17.8분대에 나타났으며 측정된 표준물질의 t_r 들이 0.17-4.40%의 상대표준편차(RSD, %)를 보이고 있어서 macrolide계 표준물질의 peak의 재현성이 높다는 것을 알 수 있었다. 그리고 시료에 표준용액을 첨가한 시료(spike sample, 50 ng/g)의 크로마토그램에서도 동일한 t_r 를 나타냄을 확인할 수 있었다.

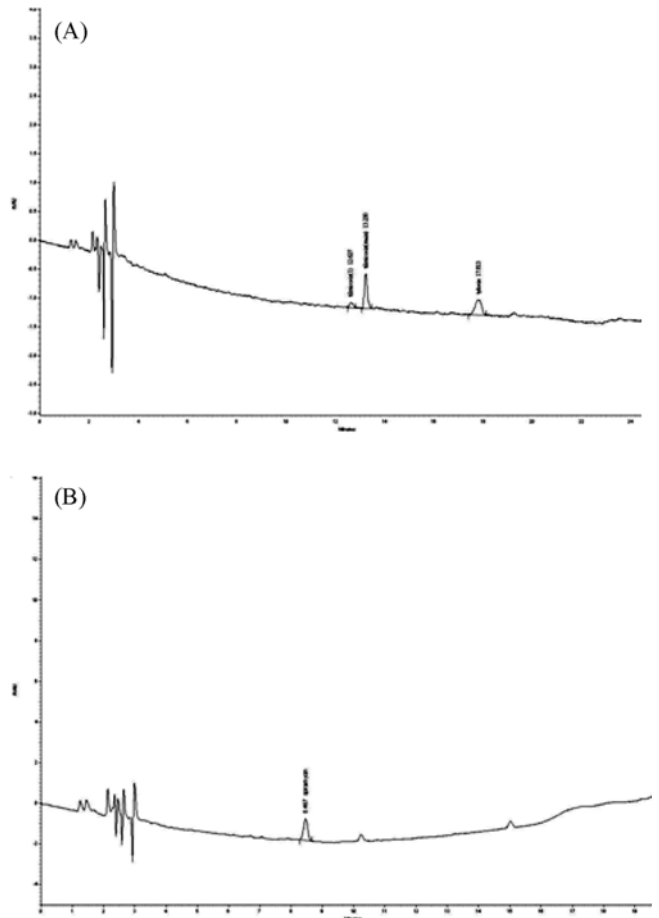


Fig. 2. Typical chromatogram of macrolide antimicrobials (A: tilmicosin and tylosin at 232 nm, B: spiramycin at 288 nm).

Macrolide계의 분석법의 유효성

축산물(쇠고기 및 돼지고기)에 macrolide계 항생물질 표준용액을 최종농도가 50 및 100 ng/g이 되도록 첨가하여 확립된 시험방법의 정확도와 정밀도를 조사하였다. 각각의 조건에서 회수율은 Table 2와 같이 83.0-90.2%이고 상대표준편차(RSD, %)는 1.9-6.4%로 비교적 높은 정확도와 정밀도를 갖는다는 것을 알 수 있었다. 그리고 쇠고기 및 돼지고기를 비교하였을 때 유사한 회수율을 나타내었으며, 농도별로 비교하였을 때도 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이는 본 연구에 적용된 전처리 방법이 쇠고기와 돼지고기 중에 잔류하는 macrolide계 항생물질을 분석하는데 적절함을 알 수 있었다. Dubois 등(7)은 근육, 신장, 간장, 달걀, 및 우유로부터 회수율이 spiramycin의 경우 각각 85, 57, 58, 53 및 103%라고 했고, tylosin은 93, 64, 78, 66 및 115%라고 했으며, tilmicosin은 115, 56, 47, 92 및 53%라고 보고하고 있다. 그리고 Carolyn 등(12)은 tilmicosin이 닭, 소, 돼지 및 양에서 경우 73-98%의 회수율을 보인다고 보고했다. 이와 같은 기존의 연구와 본 연구의 실험 결과를 비교하였을 때, HPLC를 이용한 spiramycin, tylosin, tilmicosin의 동시분석에 있어서 시료의 차이에 대한 회수율이 기존 연구에 비해 대체적으로 좋은 결과를 보였다.

HPLC를 이용하여 macrolide를 정량하기 위하여 표준품을 농도별(50, 100, 500 및 1000 ng/g)로 희석하여 검량선을 작성한 결과 및 검출한계, 정량한계는 Table 3과 같다. 분석 대상인 3종의 macrolides(tilmicosin, tylosin, spiramycin)는 50-1000 ng/g의 농도구

Table 2. Recovery percentage of macrolides from sample spiked with solution of macrolides (n=3)

Compounds	Fortification (ng/g)	Recovery±SD (%)	
		Pork	Beef
Tilmicosin	50	89.0±5.2	87.5±6.4
	100	90.2±4.2	87.0±4.0
Tylosin	50	84.4±3.5	83.0±3.7
	100	87.4±4.5	84.8±3.2
Spiramycin	50	83.5±3.4	82.1±1.9
	100	83.9±2.3	83.3±3.1

Table 3. Linearity, Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) for macrolides

Compounds	Calibration curve ¹⁾²⁾	r ²	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)
Tilmicosin	$Y=172.79X-639.42$	0.9991	12	38
Tylosin	$Y=87.27X+246.51$	0.9999	12	38
Spiramycin	$Y=75.49X+529.17$	0.9994	7	22

¹⁾Standard concentrations used in calibration curve were 50, 100, 500, 1000 µg/L

²⁾X: concentration (µg/L), Y: peak area

간에서 0.999 이상의 직선성(r^2)을 나타내었으며, 이 검량선에서 산출된 검출한계는 각각 spiramycin, tilmicosin 및 tylosin은 각각 7.3, 12.7, 12.8 ng/g이었고 정량한계는 22.2, 38.6, 38.7 ng/g이었다. Carolyn 등(12)은 닭, 소, 돼지, 양에서 가식부위와 비가식부위로 나누워 tilmicosin의 잔류량을 검사에 대하여 검출한계는 25 ng/g라고 보고하고 있다. 하지만 닭의 경우 신장과 간장부위에서 60 ng/g으로 검출의 민감도가 낮아졌다고 하였다. 또한 Garcia-Mayor 등(5)은 양의 우유로부터 spiramycin, tylosin의 검출한계가 24.1 ng/g이라고 보고 했으며, Dubois 등(7)은 macrolide계 항생물질에 대하여 검출한계가 0.01-37 ng/g라고 보고하고 있다. 그러나 위에서 언급한 분석방법은 LC/MS/MS를 이용한 검출한계를 나타낸 것으로서, 본 연구에서 수행한 HPLC의 결과와 비교했을 때 확립된 분석법이 보다 선택적으로 우수한 방법임을 알 수 있었다. 또한 이 방법의 검출한계와 정량한계가 국내·외의 잔류허용기준에 적합한 분석방법임을 알 수 있으며 다양한 식품군에 적용할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구내용인 식품 중 macrolide계 항생물질 3종을 동시에 분석하는 방법은 향후 유통 및 수입 식품의 안전을 확보하기 위한 분석에 유용하게 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 4. The number, food type, and origin of samples purchased from each city for monitoring and summary of veterinary drug residue results

City	Sampling informations			Monitoring results	
	Number of sample	Food types	Origins	Veterinary drug	Number of violations
Seoul	24		Australia	Tilmicosin	0
Busan	20		New Zealand		
			Canada		
Incheon	40	Fresh, frozen and dried meat, can, ham and sausage	France	Tylosin	0
Daegu	12		Denmark		
Daejeon	16		Spain	Spiramycin	0
			USA		
Gwangju	14		Netherlands		

유통수입식품 중 macrolide계 잔류량 모니터링

유통되고 있는 수입축산물에 대한 macrolide계 항생물질의 잔류량을 모니터링하기 위하여 전국 6개 주요 광역도시에 유통되고 있는 수입 축산물 및 이를 이용한 가공품을 대상으로 시료를 구입하였으며, 이때 수출국의 표기가 정확한 것으로 선정하였다. 검체 수거 현황은 Table 4에 나타내었으며 전체적으로 126건 구입하였다. 신선 및 냉동육은 대부분 쇠고기와 돼지고기였으며, 수입원료를 이용한 축산가공품이 거의 존재하지 않았으며 종류에 있어서도 건조품(육포) 정도였다. 그리고 광우병 등과 같은 가축 질병의 가능성에 의해 수입이 제한된 것이 다수 존재하여 Table 4에서 보는 바와 같이 소고기는 대부분 호주 또는 뉴질랜드산인 반면, 돼지고기는 수출국이 프랑스 등으로 제한적이었다.

위에서 확립된 분석방법은 수거된 모든 시료에서 macrolide계 항생물질의 잔류를 확인하기 위하여 적용하였다. 우선 크로마토그램을 기준으로 표준물질과 시료 peak의 머무름 시간(t_R)을 확인했고, macrolide계 시료의 정성을 위하여 PDA spectrum을 표준물질과 비교하였다. 그 결과, 126건의 수입 축산물 및 그 가공품에서 macrolide계 항생물질이 검출되지 않았으며, 이는 시료 내에 분석대상물질이 검출한계 이하로 잔류하거나, 존재하지 않다는 것을 확인할 수 있다(Table 5).

요 약

축산물 중 macrolide계 항생물질 3종을 신속분석하기 위하여 효과적인 전처리법을 설정하고 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용한 동시분석법을 제시하였다. 대상물질은 tilmicosin, tylosin, spiramycin이며, 확립된 분석법을 이용하여 모니터링을 실시하기 위하여 전국 6개 도시인 서울, 부산, 대전, 인천, 대구, 광주에서 수입원산지 표시된 쇠고기와 돼지고기 및 그 가공품을 수거하여 분석하였다. 전처리법에 있어서 solid phase extraction(SPE)법에 비하여 액상추출법이 더 높은 회수율을 나타내었으며 전처리 단계도 간단하여 대상 항생물질을 분석하기에 적절하였다. 3종의 항생물질 분리를 위한 컬럼은 C18(250 mm×4.6 mm, 5 µm)을 사용하였으며, HPLC 이동상은 0.025M phosphate buffer(pH 2.5) 및 acetonitrile을 이용한 gradient 조건을 설정하였다. UV 검출파장은 spiramycin 경우 232 nm이고, tilmicosin과 tylosin은 288 nm를 이용하였다. 평균회수율은 83.0-90.2%이었으며, 검출한계는 각각 7 (spiramycin), 12(tilmicosin), 12(tylosin) ng/g으로 나타났다. 수입 축산물의 항생물질에 대한 안전성을 검토하기 위하여 국내 유통 중인 수입축산물 및 그 가공품을 대상으로 하여 모니터링을 실시한 결과, 시료는 전국 6개 대도시에서 126건 구입하였으며 모든 시료에서 macrolide계 항생물질이 검출되지 않았다.

감사의 글

본 논문은 2006년도 식품의약품안전청 자체연구개발과제(06171 안제강084-3)의 수행에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

문헌

- Horie M, Saito K, Ishii R, Yoshida T, Haramaki Y, Nakazawa H. Simultaneous determination of five macrolide antibiotics in meat by high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 812: 295-302 (1998)
- Horie M, Takegami H, Toya K, Nakazawa H. Determination of macrolide antibiotics in meat and fish by liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 492: 187-197 (2003)
- Huebra MJG, Vincent U. Analysis of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J. Pharmaceut. Biomed.* 39: 376-398 (2005)
- Kanfer I, Skinner MF, Walker RB. Analysis of macrolide antibiotics. *J. Chromatogr. A* 812: 255-286 (1998)
- Garcia-Mayor MA, Garcinuno RM, Fernandez-Hernando P, Durand-Alegria JS. Liquid chromatography-UV diode-array detection method for multi-residue determination of macrolide antibiotics in sheep's milk. *J. Chromatogr. A* 1122: 76-83 (2006)
- Abuin S, Codony R, Compano R, Granados M, Prat MD. Analysis of macrolide antibiotics in river water by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1114: 73-81 (2006)
- Dubois M, Fluchard D, Delahaut ES. Identification and quantification of five macrolide antibiotics in several tissues, eggs and milk by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 753: 189-202 (2001)
- Huebra MJG, Vincent U, Holst C. Sample preparation strategy for the simultaneous determination of macrolide antibiotics in animal feedingstuffs by liquid chromatography with electrochemical detection (HPLC-ECD). *J. Pharmaceut. Biomed.* 43: 1628-1637 (2007)
- Kan CA, Meijer GAL. The risk of contamination of food with toxic substances present in animal feed. *Anim. Feed Sci. Tech.* 133: 84-108 (2007)
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Residue Evaluation of Certain Veterinary Drugs. Food and Agriculture Organization of United Nations, Rome, Italy (2006)
- Leal C, Codony R, Compano R, Granados M, Dolors M. Determination of macrolide antibiotics by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 910: 285-290 (2001)
- Carolyn M, Wiley S, Chang JP, David T, Elsbury W, Moran J, James M, Robin S. Determination of tilmicosin residues in chicken, cattle, swine, and sheep tissues by liquid chromatography. *J. AOAC Int.* 83: 837-846 (2000)