

## 생물학적활성을 기초로 한 테트라사이클린계 항생물질 잔류스크리닝법의 개선과 식품 중 잔류허용기준 설정 개선

권진욱,<sup>1\*</sup> 윤효인,<sup>2</sup> 이규승<sup>3</sup>

<sup>1</sup>국립수의과학검역원, <sup>2</sup>충남대학교 수의학과, <sup>3</sup>충남대학교 응용생명화학과

### Epimers/Metabolites of Tetracycline Derivatives; Biological Activity and Regulation Aspects for MRL in Food

Jin-Wook Kwon,<sup>1</sup> Hyo-In Yun,<sup>2</sup> and Kyu Seung Lee<sup>3</sup> (<sup>1</sup>National Veterinary Research & Quarantine Service (NVRQS), 620-2 Amnam-dong, Seo-gu, Busan, Republic of Korea, <sup>2</sup>College of Veterinary Medicine, Chungnam Nat'l Univ., 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea, <sup>3</sup>Department of Applied Biology & Chemistry, College of Agriculture & Life Science, Chungnam Nat'l Univ., 99 Daehak-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-764, Republic of Korea)

Received: 23 February 2011 / Accepted: 22 March 2011

© The Korean Society of Environmental Agriculture

#### Abstract

**BACKGROUND:** Tetracyclines (TCs) are mainly regulated as parent compounds by bioactivity-based screening methods in food. Especially with respect to antimicrobial residues, their metabolites/epimers are also highly concerning chemicals and traditionally applied microbial detection methods are needed to improve with validation for regulatory control.

**METHODS AND RESULTS:** Detection capability and biological activity of tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC), oxytetracycline (OTC) and their epimers; anhydro-tetracycline (ATC), epianhydrotetracycline (EATC), epitetra-cycline (ETC), 4-epi-chlortetracycline (ECTC), 4-epi-anhydrochlortetra-cycline (EACTC), 4-epioxychlortetracycline (EOTC), were measured by microbial growth inhibition screening method of Korea Food Code.

**CONCLUSION(S):** Limited detection capabilities were found, *B. megaterium* and *B. subtilis* showed for TC and CTC, and *B. subtilis* for OTC. Biological potency of each epimer was also presented against various microor-

ganisms, at the level from 50% to 96%, comparing with parent TCs. It is recommended that more advanced microbial screening methods with validation are needed, and biologically active epimers are to be considered as marker residues for MRL setting of regulatory control purpose.

**Key Words:** Biological potency, Chlortetracycline, Epimer, Oxytetracycline, Tetracycline

#### 서론

생물학적 활성에 기초를 둔 잔류물질 스크리닝법은 기기 분석에 비해 상대적으로 경제적, 신속성, 용이성을 갖추고 있어, 항생-항균제, 호르몬 등을 대상으로 하는 대규모의 잔류조사나 모니터링에 널리 활용되고 있다. 더불어, 식품 검사 실험실에서는 확인·정량 이전 단계의 간이검사 목적으로도 널리 활용되고 있는데, 이러한 스크리닝 시험법의 대표적인 예로 European four-plate method (EU4pt; former EECFPT) (Council Directive 96/23/EC, 1996), USDA-FSIS의 7 plate-method (USDA-FSIS, Laboratory guidebook chapter 34.2., 2007)를 들 수 있다. 우리나라는 이의 변형된 형태로 축·수산물에 대한 항생물질 및 합성항균제의 계통별 잔류 확인 간이시험법으로 이용되고 있다 (식품공전, 2008). 그런데, 이러한 생물학적 시

\*교신저자(Corresponding author):

Tel: +82-51-603-0640 Fax: +82-51-603-0649

E-mail: jinwook@korea.kr

시험법은 기기분석 시험과는 달리, 시험목적에 따른 시험법 검증의 국제적 표준 지침 등이 없이 오랫동안 관행적으로 사용되어 왔다. 이는 시험법의 신뢰성, 적합성 검증이 필수적인 규제기관에서 큰 장벽으로 남아있었기 때문에, 이의 개선과 해결을 위해 American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS), United States Food and Drug Administration (FDA), International Pharmaceutical Federation (FIP), Health Protection Branch (HPB), Association of Analytical Chemists (AOAC)가 공동으로 1990년 Bioanalytical Method Validation (BMV) 워크숍을 최초로 개최하였다. 이후, 미국 FDA (Food and Drug Administration, 2001)는 1990년과 2000년 개최된 두 번째 워크숍의 내용을 토대로 2001년 BMV guidance를 공표하였다 (Shah, 2007). 공표된 BMV 지침서는 Full validation, Partial Validation, Cross Validation으로 나누어져 있으며, 일반적 분석 시험법에 적용되는 정의도 포함하여 기술하고 있다. 유럽의 경우는 1996년 유럽연합 국가별 도축검사 시 항생·항균제 잔류 스크리닝이 시초가 되어 (Council Directive 96/23/EC, 1996), 본 목적을 위해 지금까지도 특정 항생·항균물질의 잔류 시 세균생육의 억제력을 지표로 삼는 검사법으로 널리 활용하고 있다 (Pikkemaat, 2009). 유럽연합은 기기분석을 포함한 시험법 검증법을 제정하여 (Commission Decision 2002/657/EC, 2002) 유럽 국가 간 시험성적의 신뢰성 확보를 위한 시험법 인정체계도 구축하여 널리 적용해 왔다. 반면, 생물학적 활성에 기초를 둔 스크리닝 시험법에 대한 검증가이드라인이 기기분석에 비해 상대적으로 미흡하여, 동물용의약품 잔류스크리닝법의 검증 가이드라인 (Community Reference Laboratories Residues, 2010)을 최근에 공표하였다. 생물학적 활성을 이용한 시험법은 일차적으로 정성시험법이므로, 특정 매체에 대한 적합성, 적용가능성이 매우 중요하며, 그 중 주요 요소로 특이성/선택성 (specificity/selectivity)과 민감성 (sensitivity)을 들 수 있다. Berendsen 등 (2011)은 23개 시험소가 참가한 우유 중 항생제 스크리닝 비교속련도 시험 결과, EU4pt 등의 미생물 생육억제시험에서 높은 의양성을 (false positive)과 의음성을 (false negative)을 보고하여, 현재 유럽에서 사용하고 있는 시험법의 적합성 개선이 필요함을 시사하였다. 스크리닝법은 동일 물질에 대한 다른 매체 간 시험의 적합성은 물론, 규제 대상 원물질과 대사산물 또는 이성질체 나아가 유사 근연 화합물사이의 생물학적 활성에 따른 선택성도 매우 중요한 요소이다. 후자의 경우 중 대사산물이나 이성질체에서 나타나는 선택성은 생물학적 활성 정도에 따라 잔류허용 기준 설정 시 반영하는 것도 적극 고려해 볼 필요가 있다. 그 근거로 최근 tetracyclines (TCs)계 항생제의 환경 잔류성 연구에서 원물질은 물론 대사산물/이성질체에 대한 다수의 저항성 균주가 출현 (Halling-Sørensen *et al.*, 2002)하였다는 결과나, 유럽연합이 TCs의 식품 중 잔류허용 기준 설정에 있어 tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC)의 축산물 중 MRL 설정 시 대사화합물 (marker residue)로 모화합물과 4종의 이성질체를 포함 (EMA, 1995) 하였음을 들 수 있다. 따라서, 본 연구는 현재 우리나라에서 널리 사용하고 있는 미생

물시험법의 3종 TCs 모화합물과 주요 이성질체의 균주별 민감성 확인을 통한 적합성을 검토하고, 더불어 모화합물과 이성질체간의 생물학적 활성도 차이를 확인함으로써, 식품 중 TCs의 잔류허용 기준 설정과 시험법 개선을 위한 기초자료를 확보코자 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

TCs 표준품인 tetracycline과 epimer인 anhydrotetracycline (ATC), epianhydrotetracycline (EATC), epitetracycline (ETC), CTC와 epimer인 4-epi-chlortetracycline (ECTC), 4-epi-anhydrochlortetracycline (EACTC), OTC와 epimer인 4-epioxylchlortetracycline (EOTC)는 Fluka (Buchs, Switzerland)의 VETRANAL®, analytical standard를 사용하였으며 이들의 화학구조는 Fig.1과 같다. 모든 용매는 J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)의 ULTRA RESI-ANALY-ZED™ 급을 사용하였다.

### 미생물학적 검사법을 이용한 생물학적 활성

미생물학적 간 시험법은 식품공전에 따라 *B. megaterium* (ATCC 9885; BM), *B. subtilis* (ATCC 6633; BS), *B. stearothermophilus* (ATCC 10149; BST), *B. cereus* (ATCC 11778; BC)를 균주로 하여, BM은 pH 7.3±0.1에 1 mL의 trimethoprim solution을 배지에 첨가하고, BST는 pH 6.55±0.05, BS는 pH 7.9±0.1, BC (ATCC 11778)는 pH 5.85±0.05의 조건에서 5 paper-discs (10 mm diameter)에 각각의 표준용액을 점적 후 흡수시켜 시험하였다. 이들 균주에 대한 배양온도는 BM 45°C, BS 37°C, BC 30°C, BST 55°C로 식품공전은 저지환의 직경이 12 mm 이상인 경우를 양성으로 판정토록 하고 있으나, 각 균주별 시험물질농도에 따라 육안으로 저지환의 차이가 명확한 것은 그 이하에서도 측정하였다. 생물학적 활성도는 관측된 저지환의 직경을 토대로 원물질의 각 균주별 활성을 기준으로 하여 상대적 값으로 산출하였다.

## 결과 및 고찰

### 미생물학적 검사법

우리나라는 TCs의 잔류허용 기준을 OTC/CTC/TC의 합으로써 가축의 축종 부위, 알, 그리고 전복에 이르기 까지 0.2-1.2 mg/kg으로 정하고 있으며, 벌꿀에 대해서는 OTC로 0.3 mg/kg의 잔류허용 기준을 설정하고 있다. 그런데, 식품공전에서 제시하고 있는 시험법의 적용범위는 축수산물로 정해져 있으나, 분석 시료량이 미기재 되어있고 시험법의 적용과정 중, 개별 TCs 절대량 (amount)에 대한 미생물의 억제율이 아닌 전체 tetracycline 계열 총합의 상대적 농도단위 (ppm) 억제 수준으로 판정결과를 예측토록 되어있어 (Table 1), 시험자의 시험법에 대한 깊은 이해가 요구된다. 즉, 실제 시험자가 시험 균주에 대한 각 개별 약제의 간 검량 작성 및 내부 정도관리

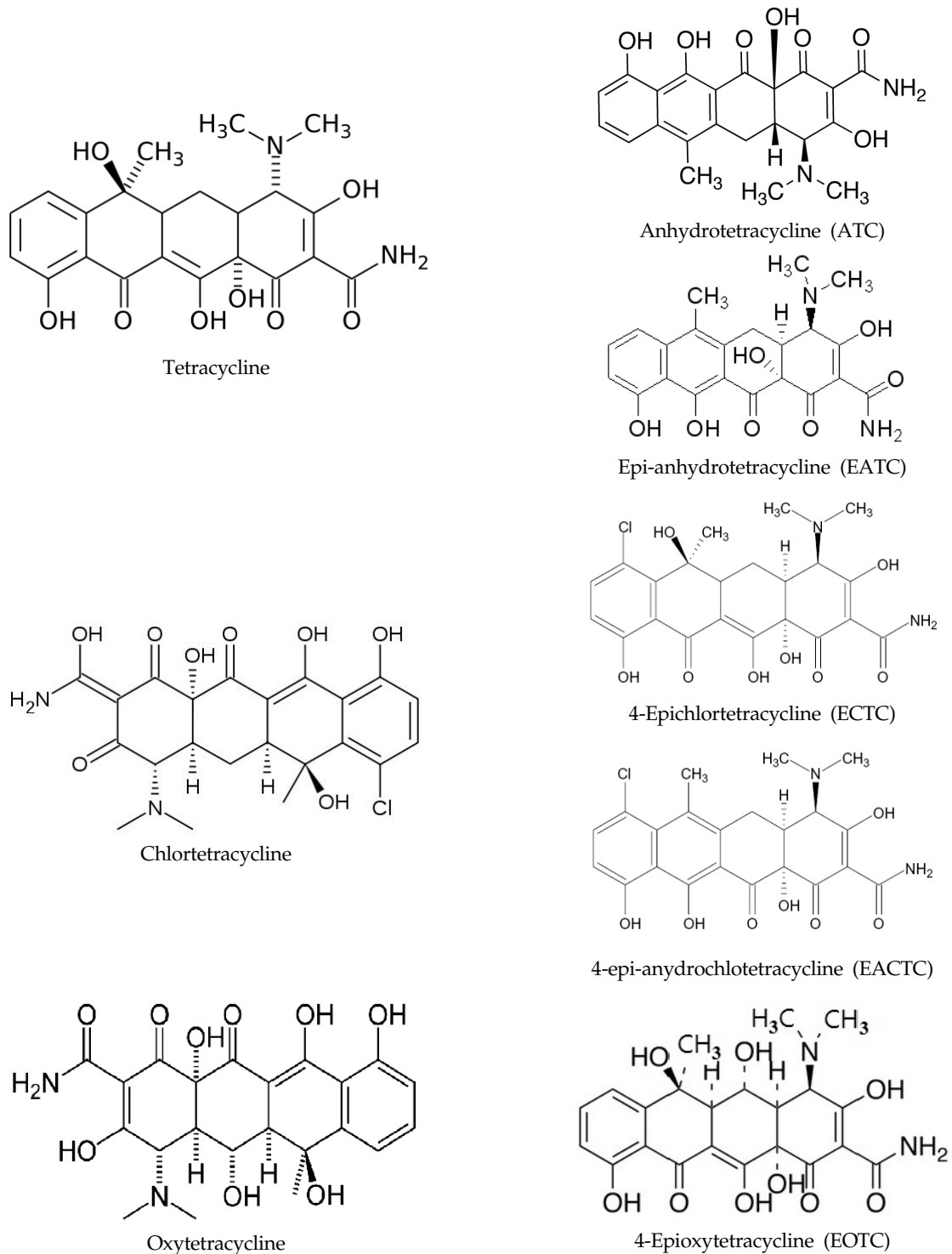


Fig. 1. The chemical structure of tetracyclines and their major epimers.

와 분석 대상별 시험법 적용 시험 없이 적용할 경우 의양성 또는 의음성 판정이 자연스럽게 유도 될 수 도 있다.

그런 이유로 본 연구에서는 정량적 판정 유도를 위해 TCs와 주요 epimer의 각 절대량에 대한 시험군주별 억제대 수준을 구하여 Table 2에 나타내었다. 약제별 억제대 수준은 0.5  $\mu\text{g}$ 의 농도에서 CTC의 *B. megaterium*에 대한 억제대 미발현을

제외하고, TC, OTC 모두 모화합물 0.5  $\mu\text{g}$ 의 농도에서 억제대를 나타내었다. 이 수준의 농도는 일반적으로 축산물 10 g을 시료로 하고, 시험과정 중 희석배율 등을 고려할 때, 개별 약제로서는 우리나라 잔류허용 기준을 충분히 검출 해 낼 수 있는 수준이었다. 그러나, 식품공전 시험법을 비롯한 유럽의 시험법 등에서 조차 각 약제에 대한 미생물 생육억제 수준이 제시되어 있지

**Table 1. Identification of antibiotics by microbial growth inhibition**

BM (MH)	BS (AM #2)	BS (AM #5)	BC (AM #8)	Antibiotics
++	++	+	++	Tetracyclines

+++;  $\leq 0.1$  ppm, ++: 0.1~1ppm, +: 1~10ppm, - (Korea Food Code, 2008)

*B. megaterium* (ATCC 9885, BM), *B. subtilis* (ATCC 6633, BS), *B. stearothersophilus* (ATCC 10149, BST), and *B. cereus* (ATCC 11778, BC)

MH; Mueller Hinton medium ( $\leq$  pH 7.3 $\pm$ 0.1), AM #2; Antibiotic medium No. 2 ( $\leq$  pH 6.55 $\pm$ 0.05), AM #5; Antibiotic medium No. 5 ( $\leq$  pH 7.9 $\pm$ 0.1), AM #8; Antibiotic medium No. 8 ( $\leq$  pH 5.85 $\pm$ 0.05)

**Table 2. The Growth inhibition of microorganisms by TCs and their epimers**

Group	Drugs	Microorganism	Amount/Diameter ( $\mu$ g/mm)		
			0.1	0.5	1 ( $\mu$ g)
Tetracyclines	TC	BM	-	20	20 (mm)
		BC	20	24	25
		BS	-	20	21
		BST	15	28	30
	ATC	BM	-	-	-
		BC	-	17	20
		BS	-	-	-
		BST	-	18	20
	EATC	BM	-	-	-
		BC	-	15	18
		BS	-	-	-
		BST	-	13	15
	ETC	BM	-	-	10
		BC	-	20	20
		BS	-	-	-
		BST	-	13	15
Chlortetracyclines	CTC	BM	-	-	-
		BC	10	28	32
		BS	-	15	15
		BST	11	30	33
	ECTC	BM	-	-	-
		BC	-	-	-
		BS	-	-	-
		BST	-	-	20
	EACTC	BM	-	-	-
		BC	-	25	25
		BS	-	-	-
		BST	-	29	30
Oxytetracyclines	OTC	BM	-	15	17
		BC	15	22	27
		BS	-	18	22
		BST	-	23	26
	EOTC	BM	-	10	12
		BC	-	15	20
		BS	-	-	-
		BST	-	20	25

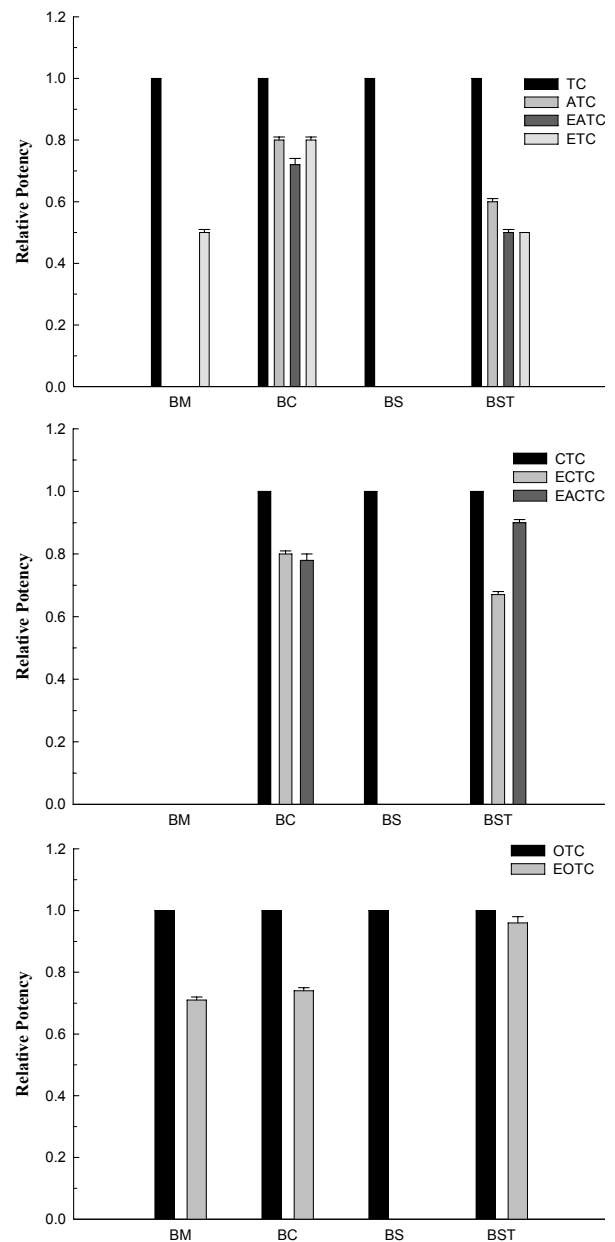
*B. megaterium* (ATCC 9885, BM), *B. subtilis* (ATCC 6633, BS), *B. stearothersophilus* (ATCC 10149, BST), and *B. cereus* (ATCC 11778, BC)

않아 본 연구 결과와 비교는 불가능 하였다. 아울러 시험방법의 관점에서 바라볼 때 이러한 결과는 TC, CTC, OTC 모두 각 모화합물의 농도가 극히 적고 대사산물/epimer의 농도가 상대적으로 높을 경우나, 혹은 TC, CTC가 모화합물로만 잔류할 경우, *B. megararium*과 *B. subtilis*는 선택성과 민감도 면에서 적합하지 않은 균주라 판단되며, OTC의 경우는 *B. subtilis*가 적합하지 않은 균주로 판정되었다. 일반적으로 미생물학적 검정법은 검출방법에 따라 전기전도도측정법 (conductimetry), 발광 (luminescence), 자외선/가시광선 분광법 (UV/Vis spectrometry), 억제대 확인법 (inhibition zone)으로 나눌 수 있다. 특히, 억제대 확인법은 버니아캘리퍼스로 약제에 의한 미생물의 생육억제 환을 측정하는 것이 가장 일반적이데, 오랫동안 약제의 계열별 잔류 유무를 확인하는 방법으로 널리 이용되어 왔고, 또 그 방향으로 주로 개발되어 왔기 때문에 시료 내 단일 물질에 대한 확인 동정으로는 제한적인 시험법으로도 알려져 있다 (Okerman *et al.*, 2003). 뿐만 아니라, 분석대상 매체의 조성 성분이 복잡한 경우, 소위 matrix effect에 의한 의양성/의음성률의 유도도 배제할 수 없으며, 검출한계 역시 매체의 유형 즉, 표준용액, 유, 고기, 신장, 알, 소변 등에 따라 달라질 수밖에 없으므로 (Bovee *et al.*, 2009), 매체별 시험법 검증을 통해 적합성을 확인하고 구체적인 적용범위를 제시하는 것이 이러한 시험법의 근본적인 활용 이유인, 경제성, 신속성, 시험의 용이성 등에 부합 된다 판단된다.

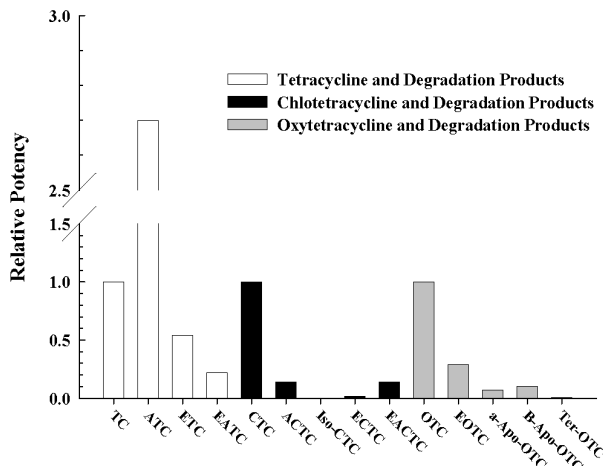
### 생물학적 활성과 잔류허용기준 설정

Tetracyclines (TCs)는 1947년 Benjamine M. Duggar가 토양 중 *Streptomyces*로부터 분리하여 (Duggar, 1948), 3종의 TCs 즉, chlortetracycline, oxytetracycline, tetracycline으로 상용화하여 인체와 동물 질병의 치료에 사용되고 있다. Tetracycline은 연령, 투여방법, 소변의 pH, 사구체 여과율 등 신장에서의 제거와 관련되는 여러 요소에 따라 그 변화는 있지만 대부분 소변을 통해 약 50~80%가 모화합물로 배설되는 것으로 알려져 있다 (Aiello, 1998). 게다가, tetracycline을 포함한 TCs계열의 약제들은 pH에 따라 그 안정성에 있어 큰 차이를 나타낼 뿐 아니라, 생산과정에서도 다양한 이성체를 함유한다고 보고되고 있다 (Søeborg *et al.*, 2004). 이러한 연유로 식품이나 환경 중 TCs는 조건에 따라 다양한 양적 분포로 모화합물/대사산물로 잔류하며, 이들 대사산물 잔류에 의한 저항성 균주의 발현 등의 생물학적인 영향도 간과되어서는 안 되는 중요한 요소라 할 수 있다. 미생물학적 잔류 분석 시험법은, 원리상 MIC50 (Minimum Inhibitory Concentration required to inhibit the growth of 50% of organisms)을 측정하는 시험법과 크게 다르지 않으므로, 각 물질의 생물학적 활성도 (biological activity, biological potency)를 유추할 수 있는 방법으로도 널리 활용될 수 있다. 따라서 Table 2의 물질별 억제대 생성을 토대로 각 약제별 1 µg 농도에서 TCs 모화합물과 epimer들 간의 상대적 활성도를 구하고 이를 Fig. 2에 나타내었다. Tetracycline의 경우 *B. subtilis*에 대해서는 모화합물만, 그리고 *B. megararium*은 ETC만이

50%의 활성도를 나타낸 반면, *B. cereus*에 대해 ATC, ETC가 각각 80%, EATC는 70%, *B. stearotherophilus*에 대해 ATC는 60%, EATC와 ETC가 각각 50%의 상대적 활성도를 나타내었다. Chlortetracycline의 경우 *B. megararium*에 대해 모화합물 및 epimer 모두 활성이 없었으며, *B. cereus*에 대해 ECTC는 80%, EACTC는 78%, *B. subtilis*에 대해서는 모화합



**Fig. 2. The relative potency of TCs and their epimers.** BM; *B. megararium* (ATCC 9885), BC; *B. cereus* (ATCC 11778), BS; *B. subtilis* (ATCC 6633), BST; *B. stearotherophilus* (ATCC 10149), TC; tetracycline, ATC; anhydro-tetracycline, EATC; epianhydro-tetracycline, ETC; epitetracycline (ETC), CTC; chlortetracycline, ECTC; 4-epi-chlortetracycline, EACTC; 4-epi-anhydrochlortetracycline, OTC; oxytetracycline, EOTC; 4-epioxchlortetracycline



**Fig. 3. Biological activity of tetracyclines and their degradation products in aerobic sludge bacteria (As reviewed by Halling-Sørensen *et al.*, 2002).**

TC: tetracycline, ATC: 5a,6-anhydrotetracycline hydrochloride, ETC: 4-epitetracycline hydrochloride, EATC: 4-epi-anhydro-tetracycline hydrochloride, CTC: chlortetracycline, ACTC: 5a,6-anhydrochlorotetracycline hydrochloride, ECTC: 4-epi-chlorotetracycline hydrochloride, EACTC: 4-epi-anhydro-chlorotetracycline hydrochloride, Iso-CTC: Isochlorotetracycline, OTC: Oxytetracycline, EOTC: 4-epi-oxytetracycline,  $\alpha$ -Apo-OTC:  $\alpha$ -apo-oxytetracycline,  $\beta$ -Apo-OTC:  $\beta$ -apo-oxytetracycline, Ter-OTC: terrinolide

물 만이 그리고, *B. stearothermophilus*에 대해 ECTC는 67%, EACTC는 90%의 상대적 활성도를 나타내었다. Oxytetracycline의 epimer인 EOTC는 *B. subtilis*에 대해 활성을 나타내지는 않았지만, *B. megaterium*에 대해 71%, *B. cereus*에 대해서는 74%, *B. stearothermophilus*의 경우 96%의 상대적 활성을 나타내었다. 본 결과를 통해 tetracycline 계열 각 epimer들이 균주에 따라 차이는 있지만 높은 생물학적 활성을 가짐이 확인되었다. 타 연구 결과와 TCs epimer의 생물학적 활성을 비교코자 문헌자료를 인용하고 이를 Fig. 3에 나타내었다. Figure 3은 호기성 오니 세균에 대한 TCs의 생물학적 활성을 나타낸 것으로 tetracycline의 경우 epimer인 ATC가 모화합물보다 2.7배 높은 활성을 나타내었으며, 모화합물과 비교시 TCs epimer인 ETC는 54%, EATC는 22%, ECTC는 2%, EACTC는 14%, EOTC는 29%의 활성을 나타냈음을 보고하고 있다 (Halling-Sørensen *et al.*, 2002).

이러한 결과는 비록 해당 균주는 서로 다르지만 본 연구 결과처럼 TCs 계열의 epimer가 상대적으로 높은 생물학적 활성을 가지고 있음을 입증하는 사례이다. 이와 함께 보다 선택적이고 높은 민감도의 미생물학적 검사법 개발과 관련하여 생각해 볼 때 문헌에 나타난 호기성 오니 세균들을 포함한 다양한 균주의 개발도 필요하며 가능하다 판단된다. 일반적으로 잔류물질 허용기준 설정 시 활성을 나타내는 모화합물과 대사산물들 대부분이 규제 대상이자 분석 대상으로 포함된다는 점을 고려하면, EMEA (1995)의 권고로 유럽연합이 정하고 있는 모화합물과 4종의 이성체를 포함한 TCs 계열의 잔류허용기준

설정은 큰 의의가 있다. 반면, 국제식품규격위원회는 1998년의 보고서를 마지막으로 최근까지 TCs 계열에 대한 잔류허용기준 재설정을 검토한 바 없는데, 당시와 비교해 볼 때 분석기술, 독성학적 평가 기법 등도 많이 발달하였고 새로운 관련 연구의 진척도 상당하므로 잔류허용 기준설정의 재논의가 국내외적으로 필요한 시점이다 할 수 있다. 그리고 이러한 검토는 비단 식품 중 잔류허용기준 설정만의 문제가 아니라, 환경 중 동물용의약품의 잔류와 위해성 평가 그리고 위해관리에 있어서도 매우 중요한 의의를 갖는다.

## 요 약

현재 우리나라에서 널리 이용되고 있는 미생물학적 검사법을 이용하여 TCs 계열의 모화합물과 epimer에 대한 검출 그리고 이를 통한 모화합물과 epimer간의 상대적 생물학적 활성도를 확인하였다. 시험법의 관점에서 낮은 선택성과 낮은 민감도를 나타낸 균주는, 다양한 적용 가능 균주의 발굴 및 적용이 시험법 검증을 통해 이루어질 필요가 있다. 극단적으로 식품 중 epimer만이 잔류하여 미생물 시험에서 의양성이 나올 경우, 기기분석을 통해 확인 정량시 원물질이 검출되지 않는다면, 이는 분석화학과 독성학의 과학적 지식을 바탕으로 볼 때 제도적 맹점으로 남을 수도 있다. 그리고, 현행 우리나라의 모화합물에 국한된 잔류허용 기준은 활성이 있는 epimer나 대사산물까지 확대하여 검토 해 볼 필요가 있으며, 이는 최근 의약품류의 환경 중 잔류실태 조사, 환경 중 위해성 평가 및 관리를 위해서도 관리 대상물질을 과학적 근거에 따라 제시해 주는 중요한 자료가 된다.

## 감사의 글

The excellent technical assistance by Hye-Jeong Chung is gratefully acknowledged. This study was funded by grant from the IAEA Research Contract No. 15578/R0 (CRP) and NVRQS Research Work B-FS08-2009-10-02.

## 참고문헌

- Aiello S.E., 1998. The Merck veterinary manual, 8th ed. Merck, Whitehouse Station, NJ, USA.
- Berendsen B.J.A., Pikkemaat, M. G., Stolker A.A.M., 2011. Are antibiotic screening approaches sufficiently adequate? A proficiency test, *Analytica Chimica Acta* 685;170-175.
- Bovee T.F., Pikkemaat M.G., 2009. Bioactivity-based screening of antibiotics and hormones. *J. Chromatogr A*. 13;1216(46):8035-50.
- Commission Decision 2002/657/EC, 2002. Implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Off. J. Eur. Commun.* L221/8.

- Community Reference Laboratories Residues (CRLs), 2010. Guidelines for the validation of screening methods for veterinary medicines (initial validation and transfer) 20/1/2010.
- Council Directive 96/23/EC, 1996. On measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. *Off. J. Eur. Commun.* L125.
- Duggar, B.M., 1948. A product of the continuing search for new antibiotics, *Ann. N.Y. Acad.Sci.* 51:177.
- EMA, 1995. Committee for Veterinary Medicinal Products. Oxytetracycline, Tetracycline, Chlortetracycline. Summary Report (3). The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. EMA/MRL/023/95.
- Food and Drug Administration, 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research.
- Halling-Sørensen B., Sengeløv G., Tjørnelund J., 2002. Toxicity of tetracyclines and tetracycline degradation products to environmental relevant bacteria, including selected tetracycline-resistant bacteria. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 42, 263-271.
- Okerman, L., De Wasch, K., van Hoof, J., Smedts, W., 2003. Simultaneous determination of different antibiotic residues in bovine and in porcine kidneys by solid-phase fluorescence immunoassay, *J. AOAC Int.* 86, 236-240.
- Pikkemaat M.G., 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Anal Bioanal Chem* 395(4):893-905.
- Shah V.P., 2007. The history of bioanalytical method validation and regulation: Evolution of a guidance document on bioanalytical methods validation, *The AAPS Journal* 2007; 9 (1) Article 5.
- Søeborg T., Ingerslev F., Halling-Sørensen B., 2004. Chemical stability of chlortetracycline and chlortetracycline degradation products and epimers in soil interstitial water. *Chemosphere* 57(10):1515-24.