Kor. J. Food Hygiene 8(4), 215-223(1993)

식육 및 우유 중 클로람페니콜의 미생물학적 검출법에 관한 연구

손성완* · 조병훈 · 진남섭 · 박종명 · 박근식
농촌진흥청 가축위생연구소

Microbiological Assay for the Detection of Chloramphenicol in Meat and Milk

Seong-Wan Son*, Byung-Hoon Cho, Nam-Seup Jin, Jong-Myung Park and Keun-Sik Park
Veterinary Research Institute, Rural Development Administration
Anyang 430-016, Korea

ABSTRACT—**Chloramphenicol (CAP) is a very effective broad-spectrum antibiotic which had been widely used in animal production. However, the drug is not approved in many countries for use in food-producing animals because of its potential toxicity and the possibility of residues in food products. In this study, a modified microbiological assay was developed for the sensitive detection of CAP residues in meat and milk. The method was characterized by the extraction of CAP with ethyl acetate, addition of 0.15 μg oxytetracycline/ml in the phosphate buffer diluent (pH 6.0), a minimal volume with Mueller-Hinton medium and cylinder cup diffusion procedures utilizing *M. luteus* ATCC 9341. The lowest levels of CAP detected in muscle tissues and milk were 0.025 μg/ml and 0.05 μg/g, respectively. Recovery rates of free CAP from milk were 68.5%, from bovine muscle 65.1%, from swine muscle 63.8%, and from chicken muscle 59.4%, respectively, and the coefficients of variation were 1.8~15.1%. The results showed that the detection limits of CAP residues in animal products could significantly be improved by the modified microbiological assay than the conventional ones.**

Keywords □ **Chloramphenicol, Microbiological assay, Meat, Milk, *M. luteus* ATCC 9341**

클로람페니콜 (Chloramphenicol, CAP)은 1947년 Burkholder에 의해 토양미생물인 *Streptomyces venezuelae* 배양액으로부터 처음 분리되었으며, 이후 그 구조가 밝혀짐에 따라 화학적으로 합성이 가능하게 되어 사람에게 뿐만 아니라 가축에서도 세균성 질병의 예방 및 치료목적으로 널리 사용되어 왔다.[1-3] 특히 가축에 대하여는 Streptococci, Staphylococci, Pasteurella, *Bordetella*, Salmomellae, *Haemophilus*, Coliforms, Chlamydia, Rickettsia, *Mycoplasma* 등 각종 미생물에 의한 감염증에 유효하기 때문에 가금의 살모넬라증과 만성호흡기질병, 소의 전신성 살모넬라증, 송아지의 호흡기 감염증 및 각종 어류 질병의 국소적, 경구 또는 주사용 제제의 형태로 널리 이용되어 왔다.

CAP의 독성에 관한 연구는 1940년 후반기 인체용 의약품으로 처음 소개될 때부터 1950년대에 광범위 항생물질로서 널리 사용될 때까지 폭넓게 이루어졌으며, 대표적인 부작용은 사람에 있어서 투여용량에 관계없이 골수기능장애에 의한 재생불량성빈혈 혹은 백혈구감소증을 나타낸다는 보고가 있었으며 이외에도 과민반응, 면역기능 장애 및 Gray 증후군증 등이 알려져 있다.[4,5,6] 또한 CAP은 투여 후에 혈청보다는 조직 중에 오랜 기간동안 높은 농도로 축적되는 경향이 있으며, 식용동물에서 조직 중 CAP의

*To whom correspondence should be adressed.
Received for publication 13 October, 1993.

잔류연구 결과 신장, 뇨 그리고 근육주사 부위에 높은 농도로 잔류되며, 송아지에 근육주사한 후 21일까지 조직에서 검출되는 것으로 보고하였다.[3]

이러한 CAP의 독성과 잔류성 때문에 미국을 비롯한 세계 각국은 CAP의 사용을 오래 전부터 엄격히 규제하고 있으며 미국에서는 식품을 생산하는 동물에 대하여 CAP의 사용을 금지하고 있을 뿐만 아니라,[7,8] 우리나라에서도 1991년부터 가축과 어류의 질병치료 및 예방목적으로 널리 사용되던 CAP을 전면 사용금지하고 축산식품에서는 검출되어서는 안되도록 규정하고 있으며 수의사의 처방에 의하여 애완 혹은 관상동물의 치료용으로만 사용할 수 있도록 제한하고 있다.

이러한 규제에도 불구하고 미국의 농무성 산하 식품안전검사청 (Food Safety and Inspection Service, FSIS/USDA)의 송아지를 대상으로 한 CAP의 잔류조사 보고에 의하면 1981년 585건 중 4건, 1982년 1,406건 중 4건, 1983년에는 1,029건 중 5건의 시료에서 CAP의 잔류가 확인되었고 잔류량은 최고 12,671 ppm부터 최저 0.02 ppm까지 검출되었으며 양성시료 13건 중 10건이 1 ppm 이상이었다고 보고하였다.[6] 우리나라에서도 1989년에 조사된 박 등[9]의 보고에 의하면 돼지 177두의 근육 및 신장 354건의 시료 중 신장 2건에서 CAP이 검출되었으며 각각 3.16 ppm 및 0.91 ppm 수준이었다.

CAP의 식용동물에 대한 불법적인 사용을 근절하고 위생적이고 안전한 축산물을 생산하기 위한 노력의 일환으로 선진 각국에서는 CAP의 잔류검사법이 활발히 개발되어 오고 있는 추세이다. 지금까지 CAP의 잔류검사법으로는 미생물학적 방법[4,10-14]을 비롯하여 GC 및 HPLC와 같은 크로마토그라프법[5,8,15-17]과 ELISA, RIA와 같은 면역화학적 방법[18-21] 등이 개발되어 이용되고 있다. 미생물학적 방법은 경제적이고 수행하기 쉬운 장점을 가지고 있으나, 감도가 낮고 특이성이 떨어지는 단점 때문에 특히 CAP의 잔류검사법으로는 검출감도가 낮다는 이유로 부적합한 것으로 평가되어 왔다.[4] 그러나 McCraken *et al.*[13]과 Singer & Katz[14]는 acetone이나 ethyl acetate와 같은 유기용매를 이용하여 시료 중 CAP을 추출 농축하고 cylinder plate method을 적용함으써 CAP의 검출감도를 높일 수 있음을 보고하였다. 따라서 이 시험은 미생물학적 방법의 경제적이고 수행하기 쉬운 장점을 이용하여 검출감도를 개선시키고 식육 및 우유 중에 잔류하는 CAP을 보다 효율적으로 검출할 수 있는 간이검사법을 확립하고자 수행하였다.

재료 및 방법

시험용 기구

시험에 사용한 기구로는 rotary evaporator (Buchi), tissumizer (Teckmar), multi-vortex mixer (VWR), centrifuge (Sorvall), water bath (제일과학), 125 m*l* centrifuge bottle (Nalgene), 100 m*l* round bottom flask (동성과학), 캘리퍼스 (200± 0.05 mm, Mitutoyo) 및 petri dish (87×15 mm, 녹십자)를 사용하였으며, 원통컵의 일종인 spider (내경 5± 0.1 mm)는 FSIS에서 제작한 원통컵모형의 stainless steel plate를 국내 제작 (태성이화학)하여 사용하였다.

시약

Chloramphenicol (CAP)은 Fluka 제품을, oxytetracycline (OTC), 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC), dipotassium phosphate (K_2HPO_4) 및 potassium phosphate (K_2HPO_4)는 Sigma 제품을, ethyl acetate 및 methanol은 J.T. Baker 제품 등을 사용하였다.

배지

계대보존용으로 Nutrient Agar (Difco), 증균용으로 Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), 시험용 배지로 Mueller-Hinton Medium (Difco)을 사용하였다.

시험용 균액의 조제

계대보존한 *Micrococcus luteus* ATCC 9341균주를 TSB 20 m*l*에 직경 2 mm 백금이로 접종하여 32℃ 항온 수조에서 16시간 진탕 배양한 다음 이 배양균액 1 m*l*를 멸균생리식염수 19 m*l*에 희석한 후 spectrophotometer 560 nm, 1.0 cm cell을 사용하여 흡광도 (absorbance)가 0.3이 되도록 조정하여 냉장보존하면서 1주일간 사용하였다. 이 때의 균농도는 약 2×10^7 cells/m*l*이었으며 이 균액을 시험용 배지 100 m*l*당 1 m*l*를 접종하여 평판을 조제할 경우 균의

농도는 배지 ml당 약2×10^5 cells이 되었다.

시험용액의 조제

가. CAP 표준용액 : 100 ml 용량플라스크에 10 mg의 CAP을 취하여 5 ml의 methanol로 녹인 다음 인산염 완충용액 (KH_2PO_4 8.0 g과 K_2HPO_4 2.0 g을 멸균증류수 1 L에 녹이고 인산을 사용하여 pH 6.0으로 조정한 완충용액)로 100 ml가 되도록 희석하여 냉장보관하면서 1주일간 사용하였다(100 μg CAP/ml).

나. OTC 표준용액 : 100 ml 용량플라스크에 적당량의 OTC를 취하여 0.1 N HCl 10 ml로 녹인 다음 멸균증류수로 100 ml가 되도록 희석하여 냉장보관하면서 1주간 사용하였다(100 μg OTC/ml).

다. 희석용 인산염 완충용액 : OTC 표준용액을 5.0 μg/ml의 농도로 희석하여 이 용액 15 ml를 취해 인산염 완충용액(pH 6.0)을 가하여 500 ml가 되도록 희석하여 사용하였다(0.15 μg OTC/ml buffer-diluent).

라. TTC 용액 : TTC 1.0 g을 증류수 1 L에 녹여 냉장보관하면서 2주간 사용하였다(0.1% TTC 용액).

시험용 평판의 조제

고압멸균하여 48~50℃로 유지한 시험용 배지 100 ml당 시험균액 1 ml를 접종하여 잘 혼합한 후 각 petri dish에 6 ml씩 분주하여 뚜껑을 살짝 열어 굳힌 후 1시간 이상 냉장보관하여 사용하였다.

CAP 첨가시료의 조제

항균물질이 함유되어 있지 않은 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기를 EEC 4-plate test[22] 및 Charm II test[19]에 의해 선발한 후 tissumizer를 사용하여 균질하게 마쇄한 식육 시료 25.0 g을 125 ml centrifuge bottle에 취한 다음 CAP 표준용액을 인산염 완충용액(pH 6.0)으로 희석한 1.25, 2.5, 6.25, 12.5 μg CAP/ml 용액 1 ml씩을 첨가하여 0.05, 0.1, 0.25, 0.5 μg/g 시료를 만들어 4℃에서 1시간 방치한 후 사용하였다. 우유의 경우 원유 50 ml에 각각 1.25, 2.5, 5.0, 12.5 μg CAP/ml 용액 1 ml씩을 첨가하여 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 ppm 농도의 시료를 조제하여 사용하였다.

시료용액의 조제

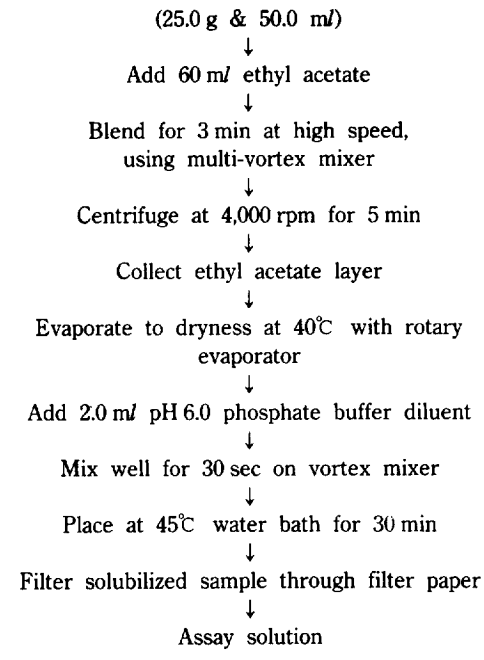

Fig. 1. Preparation of test sample for the microbiological detection of chloramphenicol residues in bovine, swine and chicken muscle tissues and in milk.

Fig. 1에서와 같이 CAP 첨가시료인 식육 및 원유에 ethyl acetate를 각 60 ml씩 가하여 multi-vortex mixer를 사용하여 고속으로 3분간 추출하고 4,000 rpm (2600×g)에서 5분간 원심분리한 다음 100 ml round bottom flask에 ethyl acetate층을 취하여 40℃ 항온수조에서 rotary evaporator로 감압농축하였다. 남은 잔류물에 희석용 인산염 완충용액 (pH 6.0) 2 ml를 첨가하여 45℃ 항온수조에서 30분간 용해시켜 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 시료용액으로 사용하였다.

표준곡선 작성 및 회수율 측정

가. 표준곡선 작성 : 매 시험마다 희석용 인산염 완충용액 (pH 6.0)을 사용하여 CAP 표준용액으로부터 0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5.0 μg CAP/ml가 되도록 희석하고 1.25 μg CAP/ml를 중간농도로 하여 AOAC의 방법[23]에 따라 표준곡선을 작성하고 slope 값을 계산하였다.

나. 회수율 측정 : 각 농도별로 5개의 CAP 첨가

Table 1. Optimized assay conditions for the detection of chloramphenicol in muscle tissues and milk by the modified microbial inhibition method

Experimental factors	Remarks
Organism	*M. luteus* ATCC 9341
Medium	Mueller-Hinton medium
Volume of agar per petri dish (thickness)	6 ml (1.0 mm)
Concentration of inoculum	2×10^5 CFU/ml agar
Extracting solvent	Ethyl acetate
Dissolving solution	pH 6.0 phosphate buffer diluent containing 0.15 μg OTC/ml
Volume of cylinder cup	300 μl
Incubation	32℃, 14 hr

Table 2. Minimum detectable level (MDL) of chloramphenicol and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) color reaction in the microbiological assay with various microorganisms

Test microorganism	MDL (μg/ml)	TTC reaction*
B. cereus ATCC 11778	5.0	+++
B. subtilis ATCC 6633	2.5	+
B. stearothermophilus ATCC 10149	5.0	−
B. stearothermophilus ATCC 7953	5.0	−
E. coli NIHJ	2.5	+
M. luteus ATCC 9341	1.25	+

*Color reaction of test microorganisms to 0.1% TTC solution: −; no color, +; red color, +++; deep red color.

시료를 처리한 시료용액에 의해 형성된 시험균의 발육억제대 직경의 평균값을 CAP 첨가시료의 최종 회석농도와 동일한 농도로 조제한 CAP 표준용액에 의해 형성된 억제대 직경의 평균값을 뺀 다음 slope 값으로 나누고 이 값(M')에 반대수를 취하여 회수율을 계산하였다.

시험방법

Table 1의 조건으로 시험용 평판에 시료용액 각 300 μl를 동심원상으로 3개의 원통에 채우고 나머지 3개의 원통에는 중간농도의 CAP 용액 혹은 CAP 첨가시료의 최종회석농도와 동일한 농도로 조제한 CAP 표준용액을 주입하여 32℃에서 14시간 배양한 다음 spider를 제거하고 각 평판에 0.1% TTC용액 5 ml를 첨가하여 충분한 발색이 될 때까지 반응시킨 후 이 용액을 제거하고 캘리퍼스를 사용하여 시험균의 발육억제대를 측정하였다.

결 과

CAP에 대한 검출감도가 가장 우수한 균주를 선발하기 위하여 가축위생연구소에서 보유하고 있는 항생물질 검정용 표준균주인 *M. luteus* ATCC 9341, *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtillis* ATCC 6633, *E. coli* NIHJ, *B. stereothermophilus* ATCC 7953 및 *B. stereothermophilus* ATCC 10149 등 6종에 대하여 CAP에 대한 검출농도로 측정하였던 바, Table 2에 나타난 바와 같이 *M. luteus* ATCC 9341이 CAP에 대한 최저검출농도가 1.25 μg/ml로 다른 시험균주에 비해 가장 우수한 결과를 나타내었다. 또한 이 시험균은 TTC 용액에 의해 *B. cereus*보다 약한 발색반응을 나타내었으나 시험균의 발육억제대 측정이 용이하였다.

시험균주의 CAP에 대한 검출감도를 향상시키기 위한 방법으로 시료 전처리의 농축과정 중 사용되는

Table 3. Synergistic effect of oxytetracycline in chloramphenicol assay procedure with *M. luteus* ATCC 9341

Detection limits of chloramphenicol (μg)	Concentration of oxytetracycline (μg/ml)			
	0.00	0.05	0.1	0.15
0.00	−	−	−	−
0.10	−	−	−	−
0.25	−	−	−	10.8*
0.50	−	−	10.3	11.6
1.00	−	10.8	12.0	13.3
1.25	11.5	12.4	13.4	14.4
2.50	13.9	14.8	15.6	16.4
5.00	18.3	19.0	19.5	20.0

*Mean inhibition zone diameter of 12 replicates.

Table 4. Sensitivity of *M. luteus* ATCC 9341 to chloramphenicol in the various assay media

Concentration of chloramphenicol (μg)	Cloramphenicol assay media				
	S-K[a]	MH[b]	AM[c]#1	AM#2	AM#4
0.125	−[d]	−	−	−	−
0.250	+[e]	+	−	+	+
0.500	+	+	+	+	+

[a] Yeast extract 6.0 g, glucose 1.0 g and agar 15.0 g per 1 L of distilled water. [b] Mueller-Hinton Medium. [c] Antibiotic Medium. [d] No growth of assay organism. [e] Growth of assay organism.

회석액에 OTC를 첨가하여 시험균주의 발육을 억제하지 않으면서 최대한의 상승효과를 나타내는 OTC 농도를 설정하였다. Table 3에 나타난 바와 같이 CAP 표준용액에 OTC를 첨가하지 않았을 때 CAP의 최저검출농도는 1.25 μg/ml이었던 반면, OTC를 ml당 0.05 μg 첨가하였을 때 0.25 μg CAP/ml의 농도까지 검출할 수 있었다. 이러한 결과로 보아 OTC로서 ml당 0.15 μg의 농도를 첨가하였을 때 OTC를 첨가하지 않은 경우에 비해 약 5배의 검출감도를 향상시키는 효과를 나타내었다.

시험용 배지에 따른 시험균주의 CAP에 대한 검출감도에 미치는 영향을 알아보기 위하여 Singer & Katz[24]가 사용하였던 S-K 배지와 Antibiotic 배지 No. 1, No. 2, No. 4 및 Mueller-Hinton 배지 등 5종의 시험용 배지를 사용하여 CAP의 농도에 따라 *M. luteus* ATCC 9341에 대한 CAP의 검출감도를 비교하였던 바, Table 4에 나타난 바와 같이 Antibiotic 배지 No 1을 제외하고는 유의한 차이가 인정되지 않았으나 Mueller-Hinton 배지가 다른 배지에 비하여 시험균의 발육저지대가 명확하게 나타남을 관찰할 수 있었다.

M. luteus ATCC 9341에 대한 CAP 이외의 다른 항균성 물질의 동시 검출여부를 알아보기 위하여 상기 OTC 첨가 회석액 및 Mueller-Hinton 배지 조건에서 Penicillin G 등 12종의 항균물질에 대해 시험균의 최저검출농도를 측정하였다. Table 5에 나타난 바와 같이 penicillin G는 0.01 μg/ml 이하이었으며, tetracycline계 항생물질은 0.02~0.08 μg/ml이었다. Macrolide계 항생물질은 0.16~2.5 μg/ml이었으며, 설파제 및 aminoglycoside계 항생물질

Table 5. Antimicrobial susceptilbility of *M. luteus* ATCC 9341 On Mueller-Hinton agar plate

Antimicrobial agents	Minimum detetable level (μg/ml)									
	0.01	0.02	0.04	0.08	0.16	0.31	0.63	1.25	2.5	5.0
β-lactams										
Penicillin G	<0.01									
Aminoglycosides										
Gentamicin										5.0
Neomycin										5.0
Streptomycin										>5.0
Macrolides										
Erythromycin					0.16					
Spiramycin									2.5	
Tylosin							0.63			
Tetracyclines										
Chlortetracycline		0.02								
Oxytetracycline				0.08						
Tetracycline		0.02								
Sulfonamides										
Sulfamethazine										>5.0
Sulfamonopyridazine										5.0

Table 6. Minimum detectable level (MDL) of chloramphenicol in milk and muscle tissues

Test sample	MDL (μg/ml or μg/g)
Bovine milk	0.025
Bovine muscle	0.05
Swine muscle	0.05
Chicken muscle	0.05

은 5.0 μg/ml 이상이었다. 이러한 결과로 보아 시험균에 대한 특이성은 설파제 및 aminoglycoside계 항생물질에 대해 매우 높게 나타남을 알 수 있었다.

식육 및 원유 중 CAP의 최저검출농도 및 회수율을 알아보기 위하여 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 및 원유에 일정량의 CAP를 첨가하여 시험하였던 바, Table 6, 7에 나타난 바와 같이 원유에서는 0.025 μg/ml, 식육에서는 0.05 μg/g까지 검출할 수 있었으며, 각 시료별 CAP의 회수율은 원유 50.2~78.4%로 평균 68.5%이었고, 쇠고기는 56.4~72.8%로 평균 65.1%이었다. 또한 돼지고기는 49.7~78.0%로 평균 63.8%이었으며, 닭고기는 51.9~74.6%로 평균 59.4%이었다. 그리고 이들 시료의 회수율에 대한 변이계수는 1.8~15.1% 범위이었다.

고 찰

우리나라의 보건사회부가 고시한 식품공전 중 축산식품의 잔류물질 시험법에서는 식육 중 잔류 CAP

Table 7. Recoveries of chloramphenicol from milk and muscle tissues

CAP added (μg/g or μg/ml)	Recovered (μg/g or μg/ml)		Recovery rates (%)		CV* (%)
	Average	Range	Average	Range	
			Bovine milk		
0.000	–	–	–	–	–
0.025	0.020	0.019~0.021	80.1	76.0~85.9	6.4
0.050	0.030	0.028~0.033	60.9	56.0~65.3	7.7
0.100	0.050	0.048~0.054	50.2	48.1~54.4	7.2
0.250	0.207	0.196~0.228	82.7	78.4~91.3	9.0
			Bovine muscle		
0.000	–	–	–	–	–
0.050	0.036	0.036~0.038	72.8	71.3~75.8	3.6
0.100	0.062	0.061~0.063	62.4	61.1~63.0	1.8
0.250	0.141	0.127~0.153	56.4	50.8~61.1	9.3
0.500	0.345	0.315~0.403	68.9	63.0~80.6	14.7
			Swine muscle		
0.000	–	–	–	–	–
0.050	0.039	0.037~0.042	78.0	73.2~84.4	5.5
0.100	0.074	0.071~0.078	74.1	71.2~77.5	4.3
0.250	0.124	0.113~0.142	49.7	45.3~56.8	4.5
0.500	0.266	0.214~0.311	53.2	42.8~62.2	15.1
			Chicken muscle		
0.000	–	–	–	–	–
0.050	0.037	0.035~0.043	74.6	69.1~85.7	12.8
0.100	0.055	0.054~0.056	54.6	54.0~55.7	1.8
0.250	0.141	0.127~0.158	56.5	50.8~63.0	10.9
0.500	0.260	0.246~0.279	51.9	49.2~55.7	6.5

*CV, the coefficients of variation.

측정법으로써 *E. coli* NIHJ를 이용한 미생물학적 방법을 채택하고 있다.[25] 그러나 이 공정분석법에는 우유 중의 잔류 CAP 검사법이 포함되어 있지 않을 뿐만 아니라 이 시험균주에 의한 식육 중 CAP의 최저검출감도 및 다른 항균물질들에 의한 CAP의 특이성 등이 제시되어 있지 않아 식육 중 CAP의 잔류를 허용하지 않고 있는 상황하에서 검출감도가 높은 시험법의 개발이 불가피한 실정이다.

이미 여러 연구자들은 미생물학적인 방법을 이용한 식육 및 우유 중 항균물질의 검출감도를 높이기 위해서는 시험균주의 항균물질에 대한 감수성이 예민하여야 할 뿐만 아니라 배지의 종류 및 두께, 시료의 전처리 방법에서의 추출용매 선정 및 농축방법 등 수많은 요인들이 복합적으로 조화를 이루어야 한다는 것을 강조하고 있다.[14,22,26,27]

식육 및 우유 중 CAP의 미생물학적 검출법의 시험용 균주로는 *E. coli, S. thermophilus, Bacilus spp, M. luteus, Clostridium perfringens* 및 해양미생물에 속하는 *Beneckea natriegens* 등이 이용되어 왔다.[4,12-14,18,20,24,25,27]

시험균주별 측정 시료에 따른 CAP의 최저검출농도는 *S. thermophilus*의 경우 우유 중에서 0.05~0.5 ppm 농도까지 측정 가능하였으며, *B. subtilis* BGA의 경우에는 근육에서 CAP의 최저검출농도가 10 ppm 수준이었던 것으로 보고한 바 있다.[27]

Nows[4]는 *B. subtilis* ATCC 6633과 *M. luteus* ATCC 9341을 이용한 Four Plate Method를 식육에 적용하였을 경우 CAP의 검출감도가 5.0 ppm 이었으나, 원물질의 CAP이 체내대사되어 약 90%까지 요로 배출되는 CAP glucuronide에 β-glucuronidase를 disc에 처리하여 신우 또는 요에 적용하면 불활성 형태를 재활성화시켜 검출감도를 높일 수 있는 방법을 제시한 바 있다.

Korsrud & Macneil[28]은 각각 *B. subtilis* ATCC 6633와 *B. megaterium* ATCC 9885를 이용한 STOP Test (Swab Test on Premises) 및 CAST (Calf Antibiotic and Sulfa Test)를 이용하여 CAP을 측정한 결과 각각 12.5 ppm 및 3.1 ppm의 검출감도를 보고한 바 있다.

또한 *C. perfringens*나 *B. natriegens*는 혈청 중 CAP의 최저검출농도가 2 μg/ml 수준이었던 것으로 보고하였다.[10,12]

이와 같이 대부분의 미생물들이 CAP에 대해서는 검출감도가 낮아 축산물 중 잔류 CAP를 추출 농축하는 전처리 과정을 거치지 않고 미생물학적 방법으로 검출하는 것에 대해서는 많은 연구자들이 부정적인 견해를 나타내었다. 따라서 McCracken *et al.*[13]은 추출용매로 acetone을 사용하여 식육 중 0.5 ppm의 검출감도와 100%의 회수율을 갖는 미생물학적 방법을 보고하였으며, 1985년 Singer & Katz[14]은 *M. luteus* ATCC 9341을 이용하여 식육에서 0.10 μg/g, 우유에서 0.25 μg/ml 수준까지 측정 가능한 미생물학적 방법을 보고하였다. 또한 회수율에 있어서도 식육에서는 61.0~71.3%, 우유에서는 79.3%의 양호한 결과를 나타내었다.

이 시험에서도 *M. luteus* ATCC 9341을 비롯하여 6종의 시험균주에 대하여 CAP에 대한 최저검출농도를 측정하였던 바, *M. luteus* ATCC 9341이 CAP 표준용액에 대하여 1.25 μg/ml로서 다른 시험균주에 비해 가장 높은 검출감도를 나타내었다.

또한 CAP에 대한 검출감도를 향상시키기 위한 방법으로 시료 전처리 과정 중 농축단계에서 잔류물을 용해하는데 사용하는 인산염 완충액 (pH 6.0)의 OTC 첨가농도는 ml당 0.15μg 농도까지 첨가하여도 시험균주의 발육을 억제하는 현상이 없었으며 ml당 0.25 μg의 CAP농도까지 검출이 가능하여 OTC를 첨가하지 않았을 때와 비교하여 검출감도를 약 5배 상승시킬 수 있었다.

식육 및 우유에 CAP 이외의 항균성 물질이 잔류될 경우 시험균의 감수성이나 추출과정에서 사용한 추출용매인 ethyl acetate에 대한 용해도, 그리고 희석액으로 사용한 희석용 인산염 완충액 (pH 6.0)에서의 활성도 등에 따라 CAP 이외의 항균성 물질에 의한 양성반응을 나타낼 수 있다.[14]

이 시험방법의 시험조건에서 *M. luteus* ATCC 9341에 대한 CAP 이외의 항균성 물질의 최저검출농도는 penicillin G 0.01 μg/ml 이하, tetracycline계 항생물질 0.02~0.08 μg/ml, macrolide계 항생물질 0.16~2.5 μg/ml, 설파제 및 aminoglycoside계 항생물질에서는 비교적 높은 것으로 나타났다.

Singer & Katz[14]의 보고에 의하면 가축질병 치료에 널리 사용되는 4종의 항균물질에 대해 특이성 시험을 하였던 바, dihydrostreptomycin은 ethyl acetate에 거의 녹지 않으며 pH 6.0에서는 시험균

주에 대한 억제율이 많이 떨어지는 경향이 있기 때문에 g 또는 ml당 0.5 μg 농도수준에서는 추출과정을 통하여 제거되므로 시험균주에는 영향을 주지 않으나 고농도로 잔류할 경우에는 다소 방해요인으로 작용할 수 있음을 시사하였다. Penicillin은 ethyl acetate에 약간 녹으며 pH 6.0에서도 활성을 유지하므로 시험균을 강력히 억제할 수 있기 때문에 penicillinase로 처리함으로써 방해를 제거할 수 있으며, OTC도 ethyl acetate에 다소 녹으며 pH 6.0에서 활성을 유지하므로 알칼리에서 불활성화하는 방법에 의해 방해를 제거할 수 있고, 또한 tylosin도 ethyl acetate에 잘 녹지 않으나 추출될 가능성을 배제할 수 없으므로 pH 6.0에서 약 70% 정도가 활성을 상실하기 때문에 방해를 최소화할 수 있을 것으로 제시하였다.

이 시험에서는 CAP 이외의 항균물질에 대해 추출용매인 ethyl acetate에 대한 용해도나 희석액으로 사용한 희석용 인산염 완충용액 (pH 6.0)에서의 활성도 차이 등에 대한 특이성 시험은 별도로 수행하지 않았으나 Singer & Katz[14]의 연구 결과를 기초로 한다면 이 시험법에서도 시험균에 대한 감수성에 따른 특이성 이외에도 여러가지 방해요인을 제거하여 특이성을 높일 수 있을 것으로 생각된다.

이 시험법은 CAP의 검출감도면에서 원유에 있어서는 0.025 ppm으로 Singer & Katz[14]와 동일한 검출감도를 보였으나, 식육에서는 McCracken *et al.*[13]이나 Singer & Katz[14]의 최저검출감도인 0.1~0.5 ppm보다 높은 0.05 ppm까지 측정할 수 있었다.

따라서 이 시험법은 식육 및 원유 중 잔류 CAP에 대한 미생물학적인 간이검사법으로 적용이 가능할 것으로 생각되며, 규제검사에 응용될 경우 양성시료에 대해서는 HPLC나 GC 등의 크로마토그라프법에 의해 최종확인검사가 수반되어야 할 것으로 생각된다.

국문요약

클로람페니콜은 광범위 항생물질로서 수의축산분야에서 널리 사용되어 왔으나 이 제제의 잠재적인 독성과 축산식품 중 잔류성 때문에 세계 각국에서는 식용동물에서의 사용을 금지하고 있다. 따라서 이 시험에서는 미생물학적 방법에 의한 우유 및 식육 중 미량의 잔류클로람페니콜을 측정할 수 있는 방법을 확립하고자 *M. luteus* ATCC 9341을 시험용 균주로 설정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 1. 검출감도를 향상시키고자 시험평판용 Mueller-Hinton 배지의 배지량을 최소화하고 ethylacetate로 추출 농축하여 ml당 0.15 μg의 옥시테트라사이클린을 첨가한 희석용 인산염 완충액 (pH 6.0)으로 잔류물을 용해하여 사용하였을 때 가기장 좋은 검출감도를 나타내었다. 2. 시료별 최저검출농도는 원유가 0.025 ppm이었으며, 식육은 0.05 ppm까지 검출할 수 있었다. 3. 시료별 평균 회수율은 원유가 68.5%이었으며, 쇠고기, 돼지고기 및 닭고기는 각각 65.1%, 63.8% 및 59.4%이었다. 이들 시료의 회수율에 대한 변이계수 (CV)는 1.8~15.1%이었다.

참고문헌

1. Allen, E.H.: Review of chromatographic methods for chloramphenicol residues in milk, eggs, and tissues from food-producing animals. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 990-999 (1985).
2. Whitlock, R.H.: Therapeutic strategies involving antimicrobial treatment of the gastrointestinal tract in large animals. *J.A.V.M.A.*, **85**, 1210-1213 (1984).
3. Chloramphenicol theraphy in large animals. *J.A.V.M.A*, **178**, 309-310 (1981).
4. Nouws, J.F.M.: Tolerances and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals. *Archiv. fur Lebensmittelhygiene.* **32**, 103-110 (1981).
5. Wal, J.M., Peleran, J. and Bories, G.F.: High performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 1044-1048 (1980).
6. The hazard of using in chloramphenicol in food animals. *J.A.V.M.A.* **185**, 930-931 (1984).
7. Epstein, R.L., Randecker, V., Corrao, P., Keeton, J.T. and Cross, H.R.: Influence of heat and cure preservatives on residues of sulfamethazine, chloramphenicol, and cyromazine in muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 1009-1012 (1988).
8. Sanders, P., Guillot, P., Dagorn, M. and Delmas, J.M.: Liquid chromatographic determination of chloramphenicol in calf tissues: Studies of stability in muscle, kidney and liver. *J. Assoc. Off. Anal.*

Chem., **74**, 483-486 (1991).
9. Park, J.M., Son, S.W., Cho, T.H., Cho, J.H., Namgung, S., Park, K.S. and Lee, M.H.: Determination of antibiotic residues in pork and poultry. *Kor. J. Vet. Publ. Health*, **14**, 61-68 (1990).
10. Bannatyne, R.M. and Cheung, R.: Chloramphenicol Bioassay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **16**, 43-45 (1979).
11. Korsrud, G.O., Naylor, J.M., Salisbury, C.D. and Macneil, J.D.: A comparision of three bioassay techniques for the detection of chloramphenicol residues in animal tissues. *J. Agric. Food Chem.* **35**, 556-559 (1987).
12. Louie, T.J., Tally, F.P., Bartlett, J.G. and Gorbach, S.L.: Rapid microbiological assay for chloramphenicol and tetracyclines. *Antimicrob. Agents Chenother.* **9**, 874-878 (1976).
13. McCracken, A., O'brien, J.J. and Campbell, N.: Antibiotic residues and their recovery from animal tissues. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 129-135 (1976).
14. Singer, C.J. and Katz, S.E.: Microbiological assay for chloramphenicol residues. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 1037-1041 (1985).
15. Haagsma, H., Schreuder, C. and Rensen, E.R.: Rapid sample preparation method for the determination of chloramphenicol in swine muscle by high-performance liquid chromatograph. *J. chromatogr.*, **363**, 353-359 (1986).
16. Jin, N.S., Yoon, H.J., Lee, W.C., Cho, B.H., Son, S.W., Park, J.M. and Park, K.S.: A study on the determination of CAP residues in beef, pork and chicken by HPLC. *Kor. J. Vet. Publ. Health.* **16**, 257-266 (1992).
17. Nelson, J.R., Copeland, K.F.T., Forster, R.J., Campbell, D.J. and Black, W.D.: Sensitive gas-liquid chromatographic method for chloramphenicol in animal tissues using electron-capture detection. *J. Chromatogr.* **276**, 438-444 (1983).
18. Arnold, D. and Somogyi, A.: Trace analysis of chloramphenicol residues in eggs, milk, and meat: Comparison of gas chromatography and radioimmunoassay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 984-990 (1985).
19. Charm, S.E.: Charm II test for antimicrobial drugs in tissue: *Operator's manual*. p. 12. Malden, MA, Charm Science Inc., 1992.
20. Lietman, P.S., White, T.J. and Shaw, W.V.: Chloramphenicol: an Enzymological microassay. *Antimicrob. Agents Chemother.* **10**, 347-356 (1976).
21. Water, C.V.D. and Haagsma, N.: Sensitive streptavidin-biotin enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of chloramphenicol residues in swine muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **73**, 534-540 (1990).
22. Bogaerts. R. and Brussels, F.W.: A standardized method for the detection of residues of anti-bacterial substances in fresh meat. *Fleschwirtsch.* **60**, 672-673 (1980).
23. Williams, S.: *Official methods of analysis of the association of offical analytical chemists*. 4th ed. p. 815. Arlington, A.O.A.C. Inc., (1984).
24. Simon, H.J. and Yin, E.J.: Microbioassay of antimicrobial agents. *Appl. Microbiol.*, **19**, 573-579 (1970).
25. 보건사회부: 식품공전. p. 532. 1991.
26. Bielelecka, M., Baldock, J.D. and Kotula, A.W.: Determination of antibiotics in meat using *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Food Prot.*, **44**, 194-200 (1981).
27. Russel, A.D. and Quesnel, L.B.: *Antibiotics: Assessment of antimicrobial activity and resistance.* The Society for Applied Bacteriology Technical Series No. 18. U.S. ed. p. 349. New York, Academic Press Inc., (1983).
28. Korsrud, G.O. and Macneil, J.D.: Evaluation of the Swab Test on Premises, the Calf Antibiotic and Sulfa Test, and a Microbial Inhibitor Test with standard solutions of 22 antibiotics. *J. Food Prot.*, **51**, 43-46 (1988).