J. Fd Hyg. Safety 19(4), 198–202 (2004)

식육 중 잔류물질 스크리닝법인 EEC-4 Plate Test와 Charm II Test 비교

함희진† · 김두환 · 권택부 · 이정학
서울특별시 보건환경연구원

Comparison of EEC-4 Plate Test and Charm II Test in Residual drug Screening Methods on Meats

Hee-jin Ham†, Doo-whan Kim, Taek-boo Kweon, and Jung-hark Lee
Seoul Metropolitan Government Research Institute of Public Health and Invironment

ABSTRACT – It was carried out to compare the relationship of EEC 4-plate test method and Charm II test method by HPLC. 46 only tetracyclines, 4 only sulfonamides, 4 sulfonamides + tetracyclines, one amphenicols + tetracyclines, and one amphenicols+sulfonamides+tetracyclines, it was detected on 71 porks of EEC 4-plate positive or Charm II positive by HPLC. In case of sulfonamides and chloramphenicols, two test methods had related with each other, but had no relation in tetracyclines. Also, it was 10.5%(6/57) tetracyclines, 81.8%(9/11) chloramphenicols that were EEC 4 plate positive or Charm II positive, but not detectrd by HPLC. Consequently, EEC 4-plate test method and Charm II test method were suitable by screening test on antibiotics and sulfonamides etc.

Key words: EEC-4 plate, Charm II, residues

식육에 대한 잔류물질 검사 기법으로는 HPLC,[1-6] Charm II receptor assays,[1,2,5-8] EEC-4 plate test4,[8-10] thin layer bioautography,[3] TLC,[2,3,5,7,10] ELISA,[4,8] Bioassay,[10] GC,[10] PABA plate 법,[10] TMP plate,[10] microbial assay[3] 등이 이용되고 있다. 이러한 검사기법들에 대해 EEC-4 plate, TLC 그리고 HPLC 사이,[10] Charm-II test와 HPLC 사이,[1,6] EEC-4 plate, ELISA 그리고 Charm II 사이,[4,7] Charm II, TLC 그리고 HPLC 사이[2,5]에 서로의 연관성에 대한 연구들이 많이 이루어져 있으나 EEC-4 plate와 Charm II간에 각 결과 수치별 상관 관계를 알아본 결과는 없는 실정이다.

표준균주 발육 억제대 크기를 통한 잔류물질 간이 시험법인 EEC-4 plate test와 미생물 수용체와의 반응을 통한 잔류물질 간이 검사법인 Charm II test가 항생물질과 합성항균제 잔류검사에 널리 이용되고 있는 바, 이들 상호간의 결과 수치를 비교, 분석하고 연관성을 찾아보고, 아울러 액체크로마토그래피에 의한 정량검사 결과 수치와의 비교, 분석을 통해 두 가지 스크리닝 시험법에 대한 정밀도 등을 조사, 연구하여 추후 식육에 대한 잔류물질 분석에 활용하고자 한다.

†Author to whom correspondence should be addressed.

재료 및 방법

시험재료

2004년 1월부터 2004년 9월까지 가락동 도축장에서 수거한 돈육 중 EEC-4 plate에서 양성인 돈육 검체 71건을 대상으로, -20°C의 냉동실에 보관하면서 실험에 사용하였다.

시험방법

EEC 4-plate method에 의한 정성검사 – 검사용 디스크는 직경 10 mm, 두께 1.5 mm의 멸균된 항균물질 검사용 filter paper(Advantec, Japan)를 사용하였고, 사용된 균주는 Merck사에서 시판되고 있는 *Bacillus subtilis*(BGA)-Spore suspension을 사용하였다. 배지는 미국 Merck사의 test agar pH 6.0(No. 10663), 7.2(No. 15787), 8.0(No. 10664)를 각각 사용하였다. 멸균한 배지를 48-50°C water bath에 약 2시간 동안 방치한 후 *Bacillus subtilis*(BGA) - Spore suspension의 아포액을 각각의 배지 1000 ml 당 1 ml의 비율로 첨가하였고, 시험 균액을 첨가한 후 약 1분간 잘 혼합하여 피펫으로 6 m씩 petridish(87×15 mm, 녹십자)에 분주하여(이때 배지 두께는 1 mm) 뚜껑을 살짝 열어 둔 상태로 약 30분간 방치한 후 사용하였다. 냉동보관 중인 시료를 해동시켜 멸균된 의과용 칼로 시료 중간부를 절개하고 그 사이에 filter paper를 삽입하여 시료의 육즙에 충분히 흡수시

킨 후 준비된 배지에 2매씩 부착시키고 가볍게 눌러준 다음 실온에 약 30분 방치하여 32°C 배양기에 넣어 16시간 배양한 후 결과를 판정하였다. 캘리퍼스 등을 사용하여 시험균의 발육 억제대를 측정한 결과, 디스크 직경 10 mm를 포함하여 억제대가 14 mm 이상인 평판이 하나 또는 그 이상인 경우 해당 시료를 양성으로 판정하였다.

Radioimmunoassay method(CharmII)에 의한 정성검사 – 50 ml 원심분리관에 MSU buffer을 30 ml 표지선까지 채우고, 지방이 없는 부위를 작은 크기로 자른 시료 10 g을 취해 눈금 표지선 40 ml까지 채운 후, 상기 시료 및 완충액을 믹서기에 넣고 30-60초간 균질화한다. 80°C 항온블록에서 45분간 방치한 후 얼음물(ice water bath)에 10분간 식히고 4300 rpm으로 IEC 원심분리기를 이용 10분간 원심분리하고 상층액을 여지를 사용하여 여과하였으며 M_2 buffer를 사용하여 pH 7.5로 조절한 후 시험에 사용하였다.

Charm II system Analyzer(=Charm LSC 7600, Charm Scientific Co, USA)를 이용하여 CharmII test 정제시약 키트의 시험방법에 준하여 실험하였다.

고속액체크로마토그라프(HPLC)에 의한 정량검사 – 식품공전 제 7. 일반시험법 중 15. 축산식품 중의 잔류물질시험법[11]에 의하였다.

분석조건

Items	Sulfonamides (Sm)	Tetracyclines (T)	Chloramphenicols (C)
Column	Nova-park C_{18} (3.9mm×150mm, 4μm)	Capcell pak C_{18} (4.6mm×250mm, 5μm)	μ-bondapak C_{18} (3.9mm×300mm, 10μm)
Detecter UV(nm)	270	360	278
Mobile phase	0.1M KH_2PO_4 / acetonitrile (850 / 150)	0.01M oxalic acid / acetonitrile / methano (725 / 175 / 100)	0.005M $(NH_4)_2HPO_4$ / Acetonitrile (76 / 24)
Flow rate (ml/min)	1.0	1.0	1.0

결과 및 고찰

EEC 4-plate method에 의한 검사

간이 검사인 EEC 4-plate test에서 양성을 나타낸 71건의 내역을 살펴보면, 세가지 pH 조건 모두에서 양성(pH 6.0 + pH 7.2 + pH 8.0)인 경우는 63.4%(45/71)로 가장 높게 나타났고, 그 다음으로 pH 6.0+pH 7.2 및 pH 6.0에서 각각 15.5%(11/71) 양성으로 나타나 결국 pH 6.0에서의 양성이 중요한 지표임을 알 수 있었다(Table 1).

Table 1. Screened results of residual materials by EEC 4-plate method on 71 porks

pH on Bacillus subtilis(BGA)-Spore suspension	No. of positive (%)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	45(63.4)
pH6.0+pH7.2	11(15.5)
only pH6.0	11(15.5)
pH6.0+pH8.0	2(2.8)
pH7.2+pH8.0	1(1.4)
only pH7.2	1(1.4)
Total	71(100.0)

Radioimmunoassy(CharmII) method에 의한 검사

EEC 4-plate test에서 양성을 나타낸 71건에 대해 Charm II test를 실시한 결과, only tetracyclines에서 양성인 경우가 63.4%(45/71)로 가장 많이 나타났고, 그 다음으로 only chloramphenicols에서 8.5%(6/71), sulfonamides + tetracyclines에서 7.0%(5/71)로 각각 나타났으며 EEC-4 plate test에서는 양성이었지만 Charm II test에서 음성인 경우는 9.9%(7/71)로 나타났다(Table 2).

Table 2. Screened results of residual materials by Charm-II test on 71 porks

Residual materials	No. of positive (%)
only tetracyclines	45(63.4)
only chloramphenicols	6(8.5)
sulfonamides+tetracyclines	5(7.0)
chloramphenicols+tetracyclines	4(5.6)
only sulfonamides	3(4.2)
chloramphenicols+sulfonamides+tetracyclines	1(1.4)
Not detected	7(9.9)
Total	71(100.0)

Table 3. Confirmation of residual materials by HPLC in the 71 screened porks

Residual materials	Detection range (ppm)	No. of detection
only tetracyclines	0.07-0.5	46(64.8)
only sulfonamides	0.001-0.04	4(5.6)
sulfonamides+tetracyclines	0.01-0.32	4(5.6)
chloramphenicols+tetracyclines	0.10-0.84	1(1.4)
chloramphenicols+sulfonamides+tetracyclines	0.01-1.86	1(1.4)
Not detected		15(21.2)
Total		71(100.0)

고속액체크로마토그라프(HPLC)에 의한 정밀정량검사

EEC 4-plate test에서 양성을 나타낸 71건 모두에 대해 HPLC로 정량검사를 실시한 결과 56건에서 검출되었는데, 그 중 only tetracyclines가 64.8%(46/71)로 가장 많이 나타났고, only sulfonamides와 sulfonamides+tetracyclines가 각각 5.6%(4/71)로 나타났으며, EEC-4 plate 혹은 Charm II에서 양성이었지만 HPLC에서 검출되지 않은 경우는 21.2%(15/71)로 나타났다(Table 3).

결과 비교분석

EEC-4 palte test에서 양성으로 나타난 71건 가운데 Charm II test에서 tetracycline 계열 양성으로 확인된 57건

Table 4. Results comparison of EEC 4-plate test and Charm II test on 57 porks detected in the tetracyclines by Charm II test

Positive pH on EEC-4 plate	Sample numbers	Charm II values	Sample numbers	HPLC values	Sample numbers (%)
pH6.0	1	600-699	2		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1				
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1	0.00	5(8.8)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	800-899	1		
pH7.2+pH8.0	1	900-999	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	400-499	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	3	500-599	3		
pH6.0+pH7.2	1	600-699	3	0.04-0.09	8(14.0)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2				
pH6.0	1	700-799	1		
pH6.0	4	600-699	7		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	3				
pH6.0	2				
pH7.2	1	700-799	5	0.11-0.19	16(28.1)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2				
pH6.0+pH7.2+pH8.0	3	800-899	3		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	1500-1599	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2	400-499	2		
pH6.0+pH7.2	1	600-699	2		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1				
pH6.0	1				
pH6.0+pH7.2	1	700-799	5	0.20-0.29	12(21.1)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	3				
pH6.0+pH8.0	1	800-899	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	900-999	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	1100-1199	1		
pH6.0+pH7.2	1	500-599	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2	600-699	2	0.30-0.39	6(10.5)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2	800-899	2		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	400-499	1		
pH6.0+pH8.0	1	600-699	2		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1				
pH6.0	1			0.40-0.67	10(17.5)
pH6.0+pH7.2	1	700-799	4		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2				
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2	800-899	2		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	900-999	1		
Total	57		57		57(100.0)

중 55건에서 pH 6.0에서의 결과치가 양성으로 나타나 pH 6.0에서의 양성이 tetracyclines 계열 시험에서 중요한 척도임을 알 수 있었고, EEC-4 plate와 Charm II에서 각각 양성을 나타내었으나 HPLC에서는 검출되지 않는 경우가 8.8%(5/57)로 나타나 EEC-4 plate와 Charm II가 tetracyclines 계열 시험에 대한 screening method로서 적합하다는 것을 확인 할 수 있었다. 한편, tetracycline 계열의 시험에서 EEC-4 plate와 Charm II, Charm-II와 HPLC, HPLC와 EEC-4 plate 간에 각 시험 방법들에 대한 수치 비교 결과치에서는 어떠한 연관성도 찾을 수 없었다(Table 4).

EEC-4 palte test에서 양성으로 나타난 71 건 중 Charm II test에서 sulfonamides 계열 양성으로 확인된 9건을 살펴보면, Charm-II test에서의 검출치(detected values) 500-599 사이에서 HPLC 정량검사 결과 0.30-0.39 ppm의 sulfonamides가 1건, 700-999 사이에서는 0.001-0.19 ppm의 sulfonamides가 8건 검출되어 Charm-II 검출치가 낮은 경우에 HPLC 정량 검출량이 높게 나타나, Hogg 등[1]이 Charm II 에서의 검출치 297, 404, 1,164, 그리고 1,250에서 HPLC 정량 결과 각각 0.27, 0.19, 0.08, 그리고 0.06 mg/kg의 sulfonamides가 검출된 것과 일치하였고, EEC-4 plate test에서도 pH 6.0, pH 7.2, pH 8.0 모두에서 양성으로 나타나는 등 두 시험 검사 사이에 연관성이 있었다. 한편, EEC-4 plate test와 Charm II test에서 각각 양성을 나타내었지만 HPLC에서 검출되지 않는 경우는 없었다(Table 5).

EEC-4 palte test에서 양성으로 나타난 71 건 중 Charm II test에서 chloramphenicols 계열 양성으로 확인된 11건의 결과를 보면, Charm-II test에서의 검출치(detected values) 700-799 사이에서 HPLC 정량검사 결과 0.80-1.89ppm의 chloramphenicol 2건, 0.00 ppm의 chloramphenicol 1건 각각 나타났고, 100-399 사이에서는 8건 모두 0.00 ppm으로 나타나 Charm-II test 검출치가 아주 낮은 경우는 HPLC 정량 시험에서 검출되지 않았으나 control point 근방의 양성 수치에서는 검출량이 높게 나타났을 뿐 아니라 EEC-4 plate에서도 pH 6.0, pH 7.2, pH 8.0 모두 양성으로 나타나는 등 EEC-4 plate와 Charm-II간에 연관성이 있음을 발견할 수 있었다. 한편, EEC-4 plate와 Charm II에서 각각 양성을 나타내었으나 HPLC 정량 시험에서는 검출되지 않는 경우가 81.8%(9/11)로 나타나 EEC-4 plate와 Charm II가

Table 5. Results comparison of EEC 4-plate method and Charm II method on 9 porks detected in the sulfonamides by Charm II test

Positive pH on EEC-4 plate	Sample numbers	Charm II values	Sample numbers	HPLC values	Sample numbers (%)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1	0.001	1(11.1)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2	700-799	2	0.01-0.09	6(66.7)
pH6.0+pH7.2	1	800-899	3		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2				
pH6.0	1	900-999	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1	0.10-0.19	1(11.1)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	500-599	1	0.30-0.39	1(11.1)
Total	9		9		9(100.0)

Table 6. Results comparison of EEC 4-plate method and Charm II method on 11 porks detected in the chloramphenicols by Charm II test

Positive pH on EEC-4 plate	Sample numbers	Charm II values	Sample numbers	HPLC values	Sample numbers (%)
pH6.0+pH7.2	2	100-199	2	0.00	9(81.8)
pH6.0+pH7.2	1	200-299	3		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	2				
pH6.0+pH7.2	2	300-399	3		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1				
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1		
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1	0.80-0.89	1(9.1)
pH6.0+pH7.2+pH8.0	1	700-799	1	1.80-1.89	1(9.1)
Total	11		11		11(100.0)

chloramphenicols 계열 시험에 대한 screening method로서는 적합하지만 Charm-II의 경우 낮은 수치에 대한 보완된 연구가 필요하리라는 것을 알 수 있었다(Table 6).

국문요약

잔류물질 간이 시험법으로 EEC-4 plate test와 Charm II test가 항생물질과 합성항균제 잔류검사에 널리 이용되고 있는 바, 이들 상호간의 결과 수치를 비교, 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. EEC-4 plate 혹은 Charm II에서 양성으로 나타난 돈육 71건에 대하여 HPLC로 정량 분석한 결과, only tetracyclines 46건, only sulfonamides와 sulfonamides+tetracyclines가 각각 4건씩, amphenicols+tetracyclines와 amphenicols+sulfonamides+tetracyclines가 각각 1건씩 검출되었고, 15건에서는 검출되지 않았다. Sulfonamides 계열에서 검출된 9건의 경우, Charm-II test 결과 수치가 낮은 경우에 정량 검출량이 높게 나타났고, EEC-4 plate test 결과 pH 6.0, pH 7.2, pH 8.0 모두에서 양성으로 나타나는 등 두 시험방법 간에 연관성이 있었고, chloramphenicols 계열에서 검출된 2건과 검출되지 않은 7건의 경우, Charm-II test 결과 수치가 낮은 경우에는 오히려 정량 검출되지 않았으나, control point 근방의 양성 수치에서는 검출량이 높게 나타날 뿐 아니라 EEC-4 plate test에서도 pH 6.0, pH 7.2, pH 8.0 모두에서 양성으로 나타나는 등 두 시험방법 간에 연관성이 있었다. 한편, tetracycline 계열의 경우, EEC-4 plate와 Charm-II간에 연관성은 없었다. 또한, EEC-4 plate와 Charm II에서 각각 양성을 나타내었으나 HPLC에서는 검출되지 않는 경우는 tetracyclines계열에서는 10.5%(6/57), sulfonamides계열의 경우는 없었고, chloramphenicols계열의 경우는 81.8%(9/11)로 각각 나타나 EEC-4 plate와 Charm II가 세 가지 잔류물질 시험에 대한 screening method로서 적합함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Hogg, R., Toothill, J. and Smith, C. : Screening for sulphonamides residues in animal tissue using the Charm II sequential receptor assay, *Charm test system*, 101-109 (1988).
2. Macneil, J.D., Korsrud, G.O., Boison, J.O., Papich, M.G. and Yates, W.D. : Performance of five screening tests for the detection of Penicillin G residues in experimentally injected calves, *J. of Food Protection,* **54**(1), 37-40 (1991)
3. 이철원, 김소희, 장영미, 곽효선, 백선영, 최병희, 이경옥 : 식육 중 잔류 항생물질 검사방법에 관한 연구(I), *국립보건원보*, **30**(2), 437-443 (1993).
4. Wasch K.D., Okerman, L., Croubels, S., Brabander, H.D., Hoof, J.V. and Backer, P.D. : Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat; correlation between results of screening and confirmatory tests, *Analyst,* **123**, 2737-2741 (1998).
5. Korsrud, G.O., Salisbury, C.D., Fesser, C.E. and Macneil, J.D. : Investigation of Charm test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in suspect meat samples, *Analyst,* **119**, 2737-2741 (1994).
6. Gary, O.K., Craig, D.C., Salisbury., Adrian C.E., Fesser., and James, D.M. : Laboratory Evaluation of the Charm Farm Test for Antimicrobial Residues in Meat, *J. of Food Protection,* **58**(10), 1129-1132 (1995).
7. Korsrud, G.O., Papich, M.G. Fesser, C.E., Salsbury D.C. and Macneil, J.D. : Laboratory testing of the Charm test II Receptor assays and the Charm farm test with Tissues and Fluids from Hogs Fed Sulfamethazine, chlortetracycline, and Penicillin G, *J. of Food Protection,* **59**(2), 161-166 (1996)
8. Okerman L. and Hoof J.V. : Evaluation of the European Four-Plate Test as a Tool for Screening Antibiotic Residues in Meat Samples from Retail Outlets, *J. of AOAC international,* **81**(1), 51-56 (1998).
9. Sanchez, A.M., Lorente, M.J., Castano, M.A. and Zancajo, Y.A. : Residuos de antibioticos en carnes de mataderos, *Alimentaria*, 35-37, April (1996)
10. 장기윤, 김순재, 박종명 : 돼지에 잔류된 설파제의 미생물학적 스크리닝법에 관한 연구, *한국수의공중보건학회지*, 15(1), 49-61 (1991).
11. 한국식품공업협회, 축산식품 중의 잔류물질시험법, 식품공전, 918-920, 931-932, 949-951 (2002).