J. Fd Hyg. Safety 12(1), 71 - 77(1997)

HPLC 및 신속검출방법을 이용한 우유내 Sulfamethazine의 분석에 관한 연구

김철현† · 백승천 · 문지웅
서울우유협동조합 기술연구소

Determination of Sulfamethazine Using High Performance Liquid Chromatography and Several Screening Methods

Chul-Hyun Kim†, Seung-Chun Baick, and Ji-Woong Moon
Institute of Dairy Foods Research, Seoul Dairy Co-operative

ABSTRACT — Sulfonamides, a therapeutically important group of antimicrobial drugs, are widely used to treat and prevent the acute systemic and skin infections in dairy cattle. They also pose an economic hazard through inhibition of growth of dairy starter cultures. This study was carried out to compare four screening methods for detection of sulfamethazine in milk and determine the positive milk sample by HPLC method. Sulfamethazine was used to spike at five levels of sulfamethazine. The Lac-Tek test and CharmII test were also consistent better than TTCII test and Delvo SP test in sulfamethazine detection. Analysis probabilities of obtaining a positive response with TTCII test and Delvo SP test assay at 50 ppb sulfamethazine level in milk samples were only 14%, 42% each. Whereas using the Lac-Tek test and CharmII test would have resulted in 100% identification of the five levels. Determination of sufamethazine using the HPLC method in the spiked milk were 10.64, 19.30, 30.76, 38.83 and 50.23 ppb, respectively.

Key words □ Sulfamethazine analysis, HPLC method, Rapid detection test

항생물질 및 합성항균제는 그 종류에 따라서 Gram 양성균 및 음성균 전반에 걸치는 넓은 항균 spectrum때문에 유방염과 같은 세균성질병의 치료목적으로 널리 이용되고 있다. 그러나 이들의 남용 및 오용은 여러 가지 문제를 야기하므로 이미 선진국에서는 사용가능한 항생물질류와 항균제의 종류 및 최대잔류허용한계 등을 법으로 정하여 국민건강을 보호하는 적극적인 정책을 펼쳐오고 있다. 국내에서는 일본과 마찬가지로 식품위생법에 의한 식품공전상에 식품은 항생물질 및 합성항균제를 함유하여서는 안되며, 다만 식육 및 우유 중 잔류허용기준을 설정하여 실행중에 있다.

낙농산업에 있어 항생물질 및 합성항균제가 원유에 존재할 경우 치즈나 요구르트와 같은 발효유제품내 유산균의 생육이 저해되어 생산성이 매우 감소하게 되며,[1] 오염된 목장의 일부 원유로 인해 다량의 시유가 오염되는 경우가 발생한다. 이러한 유방염 치료제로부터 유래되어 우유에 내재할 수 있는 항생물질 및 합성항균제의 검출방법에 있어 현재 주로 이용되고 있는 것으로는, 기존의 TTC 방법을 개선한 TTC(2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride)II 방법, Lac-Tek 방법(β-lactam screening test),[2] Delvo SP 방법,[3] CharmII 방법[4] 등이 있다.

유방염치료제로 이용되고 있는 합성항균제의 일종인 sulfamethazine의 경우 sulfonamide계열의 항균 및 성장촉진제로서 사람에게 전이될 경우 여러 부작용이 발생하게 됨에 따라 각국에서는 잔류허용치를 두고 있으며,[5,6] 우리나라의 경우 잔류허용기준을 10 ppb로 선정하고 있다.

현재 검출방법들이 이용되기전 국내에서 주로 사용되어 오던 TTC 방법으로는 페니실린을 비롯한 β-lactam계 항생물질에 대해서는 5 ppb 단위까지 검출이 가능하나 설파제의 경우 검출감도가 약 500~5000 ppm으로 잔류허용기준 농도 이상에서도 검출되지 않아 원유중에 미량 잔류하는 설파제를 효율적으로 검출할 수 없었으며, 이를 개선한 TTCII 방법의 경우 20~50 ppb 수준까지 검출이 가능하도록 검출범위가 향상되었으나 CharmII, Delvo SP 및 Lac-

† Author to whom correspondence should be addressed.

Tek 방법 등과 같은 속성검출 방법에 비해 정확성 및 재현성이 떨어지는 것으로 나타나 있다. 비록 CharmII, Delvo SP 및 Lac-Tek 방법 등은 TTCII 방법에 비해 상당한 경비가 소요되지만 품질향상과 제품의 안전성 등과 같은 전체적인 요인을 고려할 때 오히려 경제성이 있을 것으로 판단된다.

지금까지 언급된 미생물학적 검사방법이나 면역화학적 검사방법은 우유중 잔류물질을 신속하게 다량 검사할 수 있는 장점을 지니고 있으나 잔류허용농도(tolerance)/안전수준(safe level)또는 최대잔류허용한계(maximun residue limit, MRL)가 설정되어 있는 약물별로 확실한 검증을 하기 위해서는 정확한 정량분석이 요구된다. 현재 잔류허용에 관한 기준은 Table 1에 나타난 바와 같이 미국의 경우 잔류허용농도(tolerance)와 안전수준(safe level)으로 구분되어 설정되어 있으며, 두 가지 모두 우유의 안전성을 평가하는 객관적 기준으로 사용되고 있으나 잔류허용농도는 법적 구속력을 가진다는 차원에서 지도기준으로 사용되는 안전수준과는 의미를 달리하며, 유럽연합(EU)의 경우는 FAO/WHO의 MRL을 적용하고 있다.[6] 최근 이에 따라 이들 국가에서는 기기분석에 의한 원유 중 잔류약물의 확인 정량방법이 활발하게 이루어지고 있다.

과거에는 식품중에 존재하는 합성항균제의 정량분석 방법으로 주로 TLC(thin-layer chromatography)[7]와 bioassay[8] 방법 등이 이용되어 왔다. 그러나 이 방법들은 각 약제에 대한 특이성과 민감도가 떨어지는 경향이 있으며 현재는 GC,[9] GC-MS[10] 및 HPLC방법[11-13] 등이 주로 이용되고 있으나, GC를 이용한 정량분석의 경우 HPLC 방법에 비해 시료 전처리 과정이 비교적 복잡하고 분석조건에 따라 각 화합물을 유도체화하는데 장시간이 소요되기 때문에 주로 HPLC 방법이 이용되고 있다.

Table 1. Safe/Tolerance level for residues of antimicrobials in milk

Description	Korea (tolerance)	USA* (torerance/safe level)
Antimicrobials	ppb	
Penicillin G	4	0/5
Oxytetracycline	100	0/30
Sulfamethazine	10	0/10
Sulfadimethoxine	10	10/10
Sulfadiazine	10	0/10
Sulfathiazole	10	0/10
Sulfamerazine	10	0/10
Sulfaquinoxaline	10	-/10
Sulfachlorophyridazine	10	-/10

*CFR 21 and CVM correspondence

Heeschen과 Suhren[6]은 sulfonamide계열의 합성항균제를 Delvo SP 방법이나 CharmII 방법으로 양성판정이 나오더라도 EU와 FDA에서 정한 MRL수준 이하일 경우 이를 정확히 정량하는데는 HPLC방법이 필요한 것으로 주장하기도 하였다.

따라서 이 실험에서는 sulfonamide계열의 합성항균제 중 Lac-Tek 방법에 유일하게 검출가능한 sulfamethazine을 선정하여[2] 현재 국내에서 주로 이용되고 있는 방법들간의 검출능력을 농도별로 비교하였으며, HPLC를 이용하여 이들 검사에 이용된 시료의 최종 확인정량을 실시함에 따라 현재 시행되고 있는 잔류허용기준인 10 ppb 수준을 동시에 정성 및 정량분석할 수 있는 체계를 마련하고 허용치 이하에서도 양성판정이 나올 경우 이를 최종 확인할 수 있는 방법을 확립하고자 실시하였다.

재료 및 방법

실험에 사용된 원유는 CharmII 방법에 의해 음성으로 판정된 원유만을 선정하여 사용하였고 여기에 sulfamethazine-sodium salt(Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 10, 20, 30, 40, 50 ppb의 농도로 각각 첨가하여 각 실험에 사용하였으며, TTCII 방법을 위한 시험균주로는 *Streptococcus thermophilus* ATCC 14485를 사용하였다. CharmII 방법에 이용된 모든 시약은 CharmII test kit (Charm Science Inc., Malden, MA, USA)을 사용하였으며, Delvo SP 방법은 Delvo SP test ampoule(Gist-Brocades, MA Delft, Netherlands)을 사용하였고, β-lactam 방법은 β-lactam screening test kit(Idetec Inc., san bruno, CA, USA)을 사용하였다.

TTCII 방법

멸균된 8 m*l* 원유에 sulfamethazine용액을 농도별로 첨가하고 80°C에서 5분간 가열처리하여 37°C로 냉각시킨 후 기존의 TTC 방법보다 민감도를 상승시키기 위해 TMP(trimethoprim) 용액과 PABA(para amino benzoic acid) 용액을 각각 1 m*l* 씩 첨가하였다. 여기에 시험균액을 1 m*l*씩 첨가한 후 37°C 항온수조에서 2시간 배양시키고 0.3 m*l*의 4% TTC용액을 첨가한 후 다시 37°C에서 30~60분간 반응시켰으며, TMP control의 색상을 기준으로 하여 시료의 색상이 TMP control의 도홍색보다 현저히 옅을 경우 양성으로 판정하고 같거나 진하면 음성으로 판정하였다.

CharmII 방법

CharmII 방법은 미생물의 세포표면 및 내부에 존재하는

수용체와 항균물질이 특이적으로 결합하는 원리를 이용하여 시료내에 특정결합부위를 제공하는 미생물세포를 첨가하고 잔류항균물질을 경쟁적으로 결합하도록 반응시킨 다음 방사능을 측정하여 시료 중 잔류항균물질을 검출하는 방법으로 실험은 Charm[4]의 방법에 따라 실시하였다.

Delvo SP 방법

Delvo SP 방법은 합성항균물질에 민감한 *Bacillus strearothermophilus* 표준량 정도의 spore가 있는 agar medium을 사용하여 64℃에서 배양하면 spore가 발아되고, 이에 의해 산의 증가가 나타나며 이 산에 의해 자주색이 노란색으로 변화하게 되며, 합성항균제가 있을 경우 spore의 발아가 억제됨에 따라 산의 증가가 둔화되어 색의 변화가 없게 되는데 이러한 색의 변화에 따라 판정하는 방법으로, 시료 100 μl를 Delvo sp test ampoule에 첨가한 후 64℃에서 3시간 반응시키고 test ampoule의 자주색이 변화하지 않을 경우 양성으로 판정하였다.

Lac-Tek 방법

이 실험은 시험관의 표면에 부착된 항체에 항원이 특이적으로 반응하여 결합하는 원리를 이용한 EIA(enzyme immunoassay)방법으로 효소를 사용하여, 우유시료에 잔류항균물질이 있을 경우 잔류물질이 항체와 결합하고 나머지 잔여 부분만이 효소와 결합함으로써 발색제 첨가시 색변화가 적어 양성으로 판별되며 실험은 다음과 같이 실시하였다.

표준물질과 항생물질을 농도별로 첨가한 시료 250 μl를 각각의 시험관에 가한 후 tracer 250 μl를 첨가하여 6분동안 반응시키며 1분마다 1회씩 흔들어 주었다. 세척액으로 5회 세척시킨 후 발색제 1 ml를 넣고 다시 6분간 반응시켰는데 4분이면 푸른색으로 충분히 발색되었다. 반응 후 반응정지액 1 ml를 가하여 발색을 중지시키고 UV-VIS spectrophotometer(Shimadzu Co., Kyoto, Japan)를 이용해 405 nm에서 흡광도를 측정하여 표준물질보다 같거나 작으면 양성으로, 클경우엔 음성으로 판정하였다.

HPLC를 이용한 정량분석

HPLC 분석을 위한 전처리는 Walker 등[11]의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 시료 5 g에 acetone 25 ml를 첨가하여 추출한 후 4,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻어진 상층액에 1-propanol 5 ml를 첨가하여 용해하고 60℃에서 1 ml로 감압농축 하였다. 얻어진 농축액에 acetone 10 ml, hexane 15 ml, 30% sodium chloride용액 30 ml를 각각 첨가하여 추출하고, 하층의 추출물에 hexane 15 ml를 첨가하여 다시 추출한 후 chloroform 13 ml를 첨가하여 3회 반복 추출하였다. 얻어진 추출액에 sodium sulfate를 가하여 여과한 후 그 여과액을 60℃에서 1 ml로 감압농축하였으며, Sep-Pak alumina B cartridge (Millipore Co., Bedford, MA, USA)를 이용해 회수 하였다. 이때 Sep-Pak alumina B cartridge는 acetonitrile 10 ml로 세척하고 95% acetonitrile 10 ml로 2차 세척 후 시료를 흡착시켰으며, 흡착된 시료를 85% acetonitrile로 용출시켜 최종 분석시료로 사용하였으며, HPLC조건은 Table 2에 제시된 바와 같다.

Table 2. Instrument and operating conditions for sulfamethazine determination by HPLC

· Column	Symmetry™ C_8, 3.9×150 mm
· Guard column	Sentry™ Guard Column, 3.9×20 mm
· Mobile phase	Water/Methanol/Acetic acid (79:20:1)
· Detector	UV 254 nm
· Flow rate	1.0 ml/min
· Injection volume	10 μl

결과 및 고찰

현재 항생물질 및 합성항균제의 검출에 주로 이용되고 있는 방법인 TTCII, Delvo SP, Lac-Tek 및 CharmII 방법을 이용하여 sulfamethazine의 검출효율을 비교하였고, 이들 시료를 HPLC를 통해 정량분석 하였으며 결과는 다음과 같다.

첨가농도에 따른 sulfamethazine의 검출효율 비교

우유에 첨가된 sulfamethazine의 각각의 검출방법에 따른 농도별 양성판정비율의 비교는 Fig. 1에 나타나있다.

기존에 국내에서 주로 사용되어 오던 TTC 방법을 개선한 TTCII 방법의 경우 40 ppb 이하의 농도에서는 전혀 검출되지 않았으며 50 ppb의 농도에서도 14%만이 양성반응을 보였는데, 이 방법은 저비용 및 실험상의 편이성을 위주로 현재까지 주로 사용하여 왔으나 실험결과에 나타난 바와 같이 검출농도의 한계로 인해 새로이 시행되고 있는 잔류허용기준을 이 방법을 통해 확인하는 것은 부적절한 것으로 사료된다.

Delvo SP 방법의 경우 20 ppb 이하에서는 전혀 검출되지 않았으며, 그 이상의 농도에서도 23~42%만이 양성반응을 나타내어 McGrane 등[3]의 보고와 유사하게 나타났다. 따라서 TTCII 방법 및 Delvo SP 방법과 같은 미생물학적 방법은 β-lactam계 항생물질에 대해서는 비교적 높은 검출감도

를 가지고 있으나 sulfonamide계열의 합성항균제에 대해서는 검출감도가 상대적으로 낮아 sulfamethazine의 검출에 있어서 한계가 있는 것으로 나타났다.

그러나 이들 방법에 비해 Lac-Tek 방법 및 CharmII 방법과 같은 면역화학적 방법의 경우 10 ppb의 농도에서도 모두 100%의 양성반응이 나타나 매우 우수한 검출능력을 나타내었다. 김 등[14]에 따르면 Lac-Tek 방법을 이용하여 sulfamethazine의 검출실험을 실시한 결과 0.1 ppb까지 검출된 것으로 보고하였으며, Bioson 등[2]에 따르면 Lac-Tek 방법의 경우 sulfonamide계열의 합성항균제 중 유일하게 sulfamethazine만이 10 ppb 미만의 농도에서도 양성반응을 나타내어 사용상에 제한이 따르는 것으로 보고하였다. 또한 Garden과 Sporns[15]에 따르면 CharmII 방법의 경우 우유내 sulfamethazine을 10 ppb 이하에서도 검출하는 것으로 보고하였으며, Korsrud 등[16]은 돈육의 각 부위별 잔류된 sulfamethazine의 검출한계를 20~100 ppb로 보고하여 본 실험과는 상이한 결과를 나타내었으나 이는 시료의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 또한 Charm[4]에 따르면 미국 FDA에서 CharmII 방법을 이용하여 sulfonamide계열의 합성항균제의 검출실험을 실시한 결과 sulfamethazine의 경우 10 ppb 농도에서는 명확한 검출능력을 가진 것으로 나타나 본 실험과 일치하는 것으로 나타났다. 그러나 위 실험에서 나타난 결과와 마찬가지로 FDA의 실험에서도 sulfamethazine 이외의 sulfonamide계열의 다른 합성항균제의 경우 3~15 ppb까지 다양한 결과를 나타내어, 설정된 잔류허용기준 이하의 농도에서도 양성반응을 나타낼 가능성이 있어 정확한 함량 측정을 위한 정량분석이 수반되어야 할 것으로 나타났다.

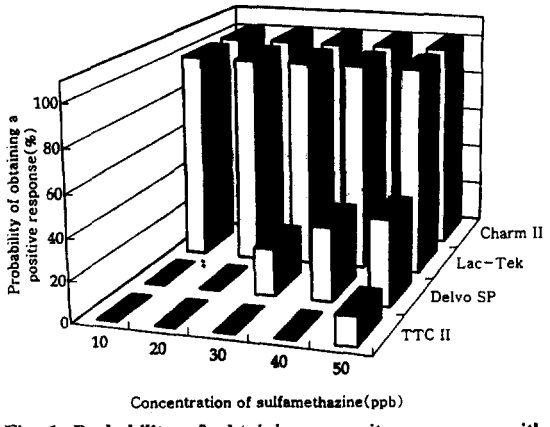

Fig. 1. Probability of obtaining a positve response with four detection methods for samples spiked with sulfamethazine at five different concentration levels.

HPLC에 의한 정량분석

HPLC방법은 과거에 주로 이용되어 왔던 TLC와 bioassay 방법과 같은 sulfonamide계열의 합성항균제의 정량분석 방법에 비해 높은 재현성, 선택성 및 검출한계가 넓은 반면, GC 또는 GLC방법에 비해 전처리 과정이 간단하고 sulfonamide계열의 합성항균제를 동시에 정량분석 할 수 있는 장점이 있다. 따라서 각 방법에 따라 양성반응을 나타낸

Table 3. Confirmation of sulfamethazine in positive milk sample by HPLC* (unit : ppb)

Treament	Added concentration	Analyzed concentratuion mean±SE
1	10	10.64±0.29
2	20	19.30±1.07
3	30	30.76±1.45
4	40	38.83±0.68
5	50	50.23±0.98

*Each data indicates a mean of triplicate

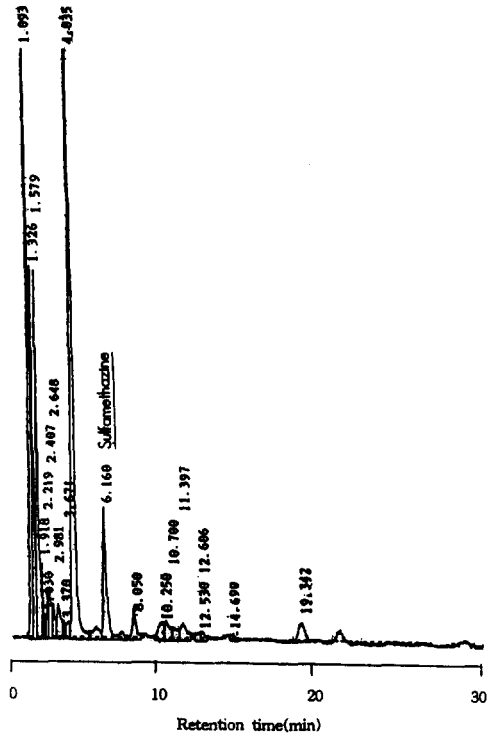

Fig. 2. HPLC chromatogram sulfamethazine fortified milk (50 ppb).

Table 4. Comparison of sulfamethazine concentration in milk using HPLC and CharmII test*

Treatment	Fortified Conc. (ppb)	Detected Conc. (ppb)±SE		Recovery (%)	
		CharmII**	HPLC	CharmII	HPLC
1	10	8.24±4.20	10.81±0.58	82.40	108.10
2	20	24.51±2.16	23.11±0.83	122.55	115.55
3	30	33.84±3.90	26.38±1.12	112.80	87.93
4	40	32.33±3.32	37.63±1.83	80.83	94.08
5	50	45.96±4.79	53.96±0.77	91.92	91.92

*Each data indicates a mean of triplicate, **463 cpm=10 ppb concentration of sulfamethazine in milk

동일시료를 HPLC를 이용하여 정량분석하였으며 결과는 Table 3에 나타난 바와 같다.

Charm 등[17]은 sulfonamide계열의 합성항균제를 검출하기 위해 receptor assay를 통해 양성반응을 보인 미국 북동부지역의 시유를 HPLC를 이용하여 정량분석한 결과 10 ppb 단위까지 검출된 것으로 보고하여 본 실험과 유사한 결과를 나타내었다. HPLC를 이용한 합성항균제의 분석은 대상분석물질의 종류에 따라 분석기기, 컬럼, 용매, 자외선 흡수파장 등을 고려하여야 하며 시료의 추출방법 또한 달라지게 된다. 정 등[18]은 HPLC의 측정파장과 컬럼 그리고 이동상용매를 각각 달리하여 근육조직내에 잔류된 합성항균제의 정량분석을 실시하였는데, 270 nm의 자외선 파장에서 5 μm 입자에 길이 220 mm 이상의 이론단수를 가지는 C_{18}이 충진된 컬럼을 이용하고, 22~25% acetonitrile용액을 이동상으로 하였을 때 가장 검출감도가 우수한 것으로 보고하였다.

CharmII 및 HPLC 방법의 회수율 비교

Sulfamethazine의 검출효율이 가장 우수한 것으로 나타난 CharmII 방법과 HPLC 방법의 회수율을 비교하기 위해 두 가지 방법을 통해 실험에 이용된 동일한 농도의 시료를 이용하여 분석하였으며 결과는 Table 4에 나타난 바와 같다.

실험에 나타난 결과에 따르면 HPLC에 의한 정량분석 방법이 CharmII 방법보다 농도별 편차가 적고 재현성이 우수한 것으로 나타났으며, 이에 따라 CharmII 방법과 같은 신속검출방법은 우유 중 잔류물질을 신속히 대량검사할 수 있으나 잔류허용기준이 설정되어 있는 약물별로 정량분석을 하기 위해서는 HPLC와 같은 정량분석기기를 이용한 확인과정이 필요한 것으로 생각된다.

Charm 등[17]은 동일 시유내의 sulfamethazine을 CharmII와 HPLC 방법을 이용하여 정량분석한 결과 이들간의 결과는 차이가 있는 것으로 보고하였으나, Kitts 등[13]은 연어내의 잔류된 sulfadimethoxine을 CharmII와 HPLC방법을 통해 정량분석하였을 때 두 방법간의 분석결과가 고도의 유의성이 있는 것으로 보고하여($P<0.001$), CharmII 방법이 HPLC와 마찬가지로 매우 정량성이 뛰어난 것으로 나타났다. 또한 Bioson 등[2]은 β-lactam계 항생물질인 penicillin G를 Lac-Tek 방법을 통해 분석하여 양성판정된 시료를 HPLC를 이용하여 최종 확인정량 하였으며, 음성판정된 시료에서도 4ppb의 penicillin G를 검출한 것으로 보고하였다. 또한 Carlsson과 Björck[19]도 우유내 tetracycline계열의 항생제를 Delvo SP, CharmII 방법 등으로 검출한 후 HPLC를 이용하여 확인정량한 결과 Bioson 등[2]과 유사한 결과를 나타내었다. Heeschen과 Suhren[6] 등은 이러한 점을 고려하여 단순히 미생물학적 면역화학적 방법만을 이용한 잔류물질 검사방법보다는, 각 잔류물질 별로 가장 적합한 방법을 선정하여 정성 및 정량분석을 집유현장에서부터 체계화하여 실시하는 것을 권장하였으며, 현재 독일 등의 국가에서는 이와 같은 체계적인 검출방법을 통해 잔류허용기준을 철저히 시행하고 있다.

따라서 우유 및 유제품의 소비가 지속적으로 증가되고 있으며, 외국 유제품의 수입이 급증하고 있는 현 시점에서 현재 국민건강 뿐만아니라 발효유제품의 품질에도 좋지않은 영향을 미치는 우유내 합성항균제의 잔류허용기준에 적합한 검사방법의 시행이 무엇보다 중요하며, 이에 따른 합성항균제 검출방법의 체계화는 매우 시급한 과제라고 생각된다.

국문요약

Sulfonamide계열의 합성항균제는 짖소에 있어 피부를 통한 급성감염 증상의 치료 및 예방에 주로 이용된다. 그러나 Sulfonamide계열의 합성항균제를 섭취할 경우 알레르기 반응이나 암 등을 유발하는 등의 부작용이 나

타나게 된다. 또한 유산균의 발육을 억제하여 유제품의 품질저하의 원인이 되기도 한다. 따라서 이 실험은 우유에 합성항균제의 일종인 sulfamethazine을 첨가하여 현재 주로 이용되고 있는 신속검출방법들을 이용하여 이들 방법간의 검출능력을 비교하였으며, 이를 HPLC를 이용하여 확인정량분석하였다. 우유에 각각 10, 20, 30, 40, 50 ppb의 농도로 sulfamethazine을 첨가하여 실험한 결과, Lac-Tek 및 CharmII 방법이 TTCII 및 Delvo SP 방법에 비해 매우 우수한 검출능력을 보였으며, 이들의 양성반응 비율을 보면 TTCII 방법과 Delvo SP 방법은 가장 높은 농도인 50 ppb 첨가구에서도 각각 14, 42% 만이 양성반응을 나타내었다. 반면에 Lac-Tek 방법과 CharmII 방법은 전 첨가구에서 100%의 양성반응을 나타내었다. 또한 HPLC를 이용하여 양성반응을 나타낸 시료들을 정량분석한 결과 10.64, 19.30, 30.76, 38.83 및 50.23 ppb로 각각 나타났다. 또한 CharmII 방법과 HPLC 방법간의 회수율을 비교한 결과 HPLC방법이 우수한 것으로 나타났다. 이러한 결과에 따라 신속검출방법에 의해 양성반응을 나타낸 시료의 잔류허용기준 적합성 판정을 위해 HPLC 방법이 유용할 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Schiffman, A. P., Schütz, P. and Wiesner, H. U.: False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures. *Milchwissenschaft,* **47**, 712 (1992).
2. Boison, J. O., Korsrud, G. O., Papich, M. G. and MacNeil, J. D.: Comparison of four commercially available rapid test kits with liquid chromatography for detecting Penicillin G residues in bovine plasma. *J. AOAC International,* **78**, 1144 (1995).
3. McGrane, P., Rowe, M. T. and Anger, S.: Evaluation of Delvotest SP and Charm AIM-96 for the detection of a range of antibiotics in milk. *Milchwissenschaft,* **51**, 330(1996).
4. Charm, S. E.: An integrated system monitoring milk for FDA "safe levels" using Charm test methods. *J. the Association of Food and Drug Offcials,* **58**, 17(1994).
5. Littlefield, N. A., Sheldon, W. G., Allen, R. and Gaylor, D. W.: Chronic toxicity/carcinogenecity studies of sulfamethazine in Fisher 344/N rats: two-generation exposure. *Food Chem. Toxicol.*, **28**, 157 (1990).
6. Heeschen, W. H., and Suhren, G.: Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk. *Milchwissenschaft,* **51**, 154 (1996).
7. Thomas, M. H., Soroka, K. E. and Thomas, S. H.: Quantitative thin layer chromatographic multi-sulfonamide screening procedure. *J. Assoc. Anal. Chem.,* **66**, 881 (1983).
8. 김교준, 김상근, 강오동: Sulfadimethoxine의 계육 및 계란내 이행잔류에 관한 연구. 농업기술연구소보. **12**, 349 (1985).
9. Matusik, J. E., Sternal, R. S., Barnes, C. J. and Spone, J. A.: Conformation of identify by gas chromatography/tendom mass spectrometry of sulfathiazole, sulfamethazine, sulfachloropyridazine and sulfadimethoxine from bovine or swine liver extracts after quantitation by gas chromatography/electron-capture detection. 1991. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **73**, 529 (1991).
10. 류재천, 양종순, 서자원, 김명수, 박종세: 식육중의 잔류항생 항균제의 검정에 관한 연구(II). 한국식품위생학회지, **8**, 9 (1991).
11. Walker, L. V., Walsh, J. R. and Webber, J. J.: High performance liquid chromatography of sulfonamides extracted from bovine and porcine muscle by solid-phase disperation. *J. Chromatography,* **595**, 179 (1992).
12. Takeda, M., and Akiyama, Y.: Rapid determination of sulfonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluoreamine derivatization. *J. Chromatography,* **607**, 31-? (1992).
13. Kitts, D. D., Zhwng, M., Flett, E. B. and McErlane, K. M.: Comparison of sulfadimethoxine residue analyses insalmon muscle using HPLC and CharmII test. *J. Food Protec.,* **58**, 678 (1995).
14. 김은아, 곽해수, 박정남, 정충일: 우유에 내재하는 항생물질 검출방법의 비교. 한국낙농학회지, **13**, 110 (1991).
15. Garden, S. W., and Sporns, P. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for sulfamerazine in milk. *J. Agric. Food Chem.,* **42**, 1379 (1994).
16. Korsrud, G. O., Papich, M. G. Fesser, A. C. E., Salisbury, C. D. C. and Macneil, J. D.: Laboratory testing of the Charm testII reseptor assay and the Charm farm test with tissues and fluids from hogs fed sulfamethazine, chlortetracycline, and penicillin G. *J. Food Protec.,* **59**, 161(1996).
17. Charm, S. E., Zomer, E. and Salter, R.: Conformation of

widespread sulfonamide contamination in northrast U.S. market milk. *J. Food Protec.,* **51,** 920(1988).

18. 정규생, 채명식, 김창동, 김종배: 액체 크로마토그라피를 이용한 동물 근육조직 중의 합성항균제 동시분석. 한국식품위생학회지, **8,** 25 (1993).

19. Chrlsson, A., and Björck, L.: Liquid chromatography vertification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assays and the CharmII test. *J. Food Protec.,* **55,** 374(1992).