

축산물중의 Tylosin 잔류물질 검사를 위한 분석법의 개발과 그 이용에 관한 연구*

김태종 · 김종배 · 이치호 · 이원창 · 윤화중

건국대학교 축산대학 및 동물자원연구센터

(1994년 11월 2일 접수)

Development of analytical method for tylosin residues in animal products and its application*

Tae-jong Kim, Jong-bae Kim, Chi-ho Lee, Won-chang Lee, Hwa-joong Yoon

College of Animal Husbandry and Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University

(Received Nov 2, 1994)

Abstract : This study was performed to develop immunoassay method of detecting the residual tylosin and to investigate the residues using HPLC(high performance liquid chromatography) in animal products.

Obtained results are the followings:

1. To develop immunoassay method, the conjugation of activated tylosin tartarate ester derivatives and BSA (bovine serum albumin) was certified at the 290nm of maximal absorbance which tylosin tartrate have.
2. The titration of anti-serum produced from rabbit immunized with the conjugator as an immunogen was too low to analyze the tylosin.
3. The residual tylosin can be detected by 0.2 ppm using HPLC.
4. Recovery of tylosin from spiked pork samples measured using HPLC was $87.4 \pm 4.0\%$.
5. When the levels of tylosin residues in swine liver and kidney were measured on HPLC. The level was over the maximum tolerance level in one out of ten samples of each organ.

Key words : immunoassay method, the residual tylosin, HPLC, the conjugator

서 론

Tylosin은 소나 돼지등의 가축들에 대한 질병치료에 사용하는 항생물질로 그 기원은 *Streptomyces fradiae*로 알려져 있다¹. 이들 항생물질이 첨가되는 경로로는 주사제나 사료에 첨가되어 사용되고 있고 이들의 지나친

사용은 결국 소고기나 돼지고기등의 축산물을 통하여 식품으로 인간에게 대량 소비되었을 때 여러가지 위험을 초래할 가능성이 크다². 고로 이러한 항생물질의 허용한계를 0.2 ppm 이하로 규정하고 있는 이유³도 인간에게 가져다 줄 이같은 여러가지 위험성을 최소화하기 위함은 물론, 최근 우루과이 라운드로 인한 농축산물의

* 본 연구는 한국과학재단지정 건국대학교 동물자원연구센터의 연구비지원으로 수행된 것임.

Address reprint requests to Dr Tae-jong Kim, College of Animal Husbandry and Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, 93-1 Mojin-Dong, Seongdong-Ku, Seoul 133-701, Republic of Korea.

수출이 둔화되고 수입이 늘어나는 상황에서 축산물의 수출을 꾀하는데도 일익을 담당하리라 믿는다.

그러나 현재 우리나라에서는 이같은 항생물질의 위험성을 방지하기 위한 대책으로써 가장 중요한 자료를 얻는 데 필요한 분석방법이 거의 확립되어 있지 않으며, 또한 있다고 해도 정확성, 경제성, 그리고 용이성 등이 부족한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 정확하고 간편한 분석방법들을 연구하기 위해 다음과 같은 실험을 실시하였다. 즉 tylosin 측정을 위한 면역분석법 개발과 표준방법으로 사용되고 있는 HPLC 방법으로 축산물중의 tylosin 잔류물질을 검사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

면역분석법에 의한 tylosin 분석

Immunogen의 준비 : Kitagawa et al¹의 방법에 따라 immunogen을 만들었는데 그 방법을 간략하게 소개하면 tylosin tartrate와 conjugation 하기 위하여 bovine serum albumin(BSA)(Sigma, USA)를 사용하였고, 반응용매로 N, N-dicyclohexyl carbodiimide(DCC)와 N-hydroxy succinimide(N-HS), dimethyl formamide(DMF) (Pharmacia, USA)를 사용하였다.

Tylosin tartrate ester 합성은 건조 질소하에서 고무마개를 부착한 5ml의 반응용기에서 완전히 건조된 dimethyl formamide 2ml에 0.06mM로 되게 tylosin tartrate 63.9mg을 첨가하여 녹인 다음 0.05mM로 되게 DCC 10mg과, 0.09mM로 되게 N-HS 10mg을 DMF에 녹인 후 tylosin tartrate가 녹아있는 반응용기에 첨가하고 하루밤동안 상온(22°C)에서 충분히 교반시켰다. 반응이 끝난 후 혼합용액에서 생성된 urea를 제거하였다. 이와같이 얻은 유도체와 BSA와의 conjugation(0.15mM로 되게 BSA 10 mg을 0.03mM sodium bicarbonate 0.5ml에 용해시킴)을 0.07mM로 되게 activated tylosin tartrate 18.1mg을 첨가시키고 암실에서 1시간 교반시켰다.

반응이 끝난 용액을 0.1M sodium bicarbonate 용액으로 4회, 그리고 증류수로 4회 dialysis시켜서 반응하지 않은 activated tylosin tartrate ester와 다른 화합물들을 제거하여 UV spectrophotometer(Kontron 860)으로 scanning하여 합성된 면역원을 확인하였다. 면역원이 포함된 용액은 동결 건조하여 -20°C에서 보관하면서 시험에 공시하였다.

Tylosin tartrate와 horseradish peroxidase

(HRP)의 conjugate 제조 : 효소면역법을 개발하기 위하여 tylosin tartrate와 HRP를 conjugation하기 위한 방법으로는 tylosin tartrate와 BSA를 conjugation한 방법과 같은 방법으로 제조하였다.

Immunization(면역화) : 준비된 immunogen을 BALB/C mouse와 rabbit에 각각 면역시켰다. mouse의 경우 0.1ml(50µg)을 취하여 동량의 Freund's adjuvant를 섞어 잘 유화시킨 다음 두 group으로 나누어 2주 간격으로 복강주사(intraperitoneal injection)와 근육주사(intramuscular injection)을 하였다. rabbit의 경우 0.5ml를 동량의 Freund's adjuvant로 유화시켜 2주 간격으로 피내주사(intradermal injection)를 하였다.

항체의 생성 확인 : 3회까지 주사한 mouse와 rabbit을 4~6일 후 채혈하여 항체 생성 여부를 조사하기 위해 mouse와 rabbit에 대한 2차 항체(anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG)를 16 well ELISA strip에 coating한 뒤, 채혈하여 준비된 혈청을 일정량씩 binding buffer(PBS 0.05 M, pH 7.4)에 희석시켜 2차 항체가 coating된 well에 첨가하였다. 이것을 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 합성된 conjugate(tylosin tartrate-HRP)를 첨가시켜 HRP substrate인 OPD solution(DW 5ml, 0.2M disodium hydrogen phosphate 2.6ml, 0.1M citric acid 2.4ml, 35% H₂O₂ 5µl, OPD 5mg)으로 발색시켰다. 모든 반응이 끝난 후 stop solution(2.5M H₂SO₄)으로 반응을 중지시키고 ELISA reader로 490nm에서 OD를 측정하여 항체 생성 여부를 확인하였다.

항체의 분리 및 정제 : 면역화시킨 rabbit에서 채혈한 혈액을 4°C에서 하루밤동안 놓아둔 후 원심분리(2500 rpm, 15분)하여 항혈청을 분리하였다. 이 항혈청은 sepharose CL-4B protein A column을 이용하여 분리 정제하였다.

이것을 간단히 소개하면 0.05% NaH₂가 포함된 pH 7.4, 0.01M, PBS buffer에 담겨 있는 gel을 결합완충용액(pH 7.4, 0.01M, PBS buffer)으로 충분히 column을 평형시킨 후 1ml의 항혈청을 gel 속에 부유시켜 15 bed volume의 결합완충용액으로 column을 세척한 다음, 용출완충액(elution buffer, pH 2.2, 1M sodium acetate)으로 항체를 용출시키고 spectrophotometer(Kontron 860)로 280nm에서 흡광도를 측정함으로써 분리 정제하였다.

HPLC에 의한 tylosin 분석

HPLC에 의한 tylosin양을 조사하기 위해서 C 18(reversed phase) column으로 flow rate 1.0 ml/min pressure : 30 bar, 0.002M 인산 암모늄 buffer를 사용하여 HPLC(Waters Co)로 검출하였다.

결 과

본 연구에서 활성화된 tylosin tartrate ester 유도체와 BSA를 conjugation 시킨 후 UV로 scanning한 결과는 Fig 1과 같다.

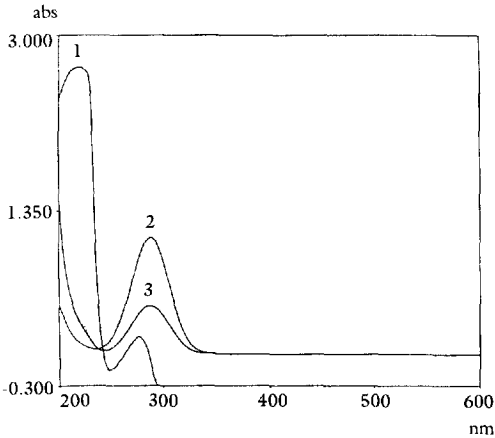


Fig 1. Ultraviolet spectra of bovine serum albumin and tylosin-BSA(1:BSA, 2:Tylosin tartrate, 3: Tylosin-BSA).

합성된 conjugate는 free tylosin tartrate나 BSA와는 다른 spectrum을 나타내면서 특히 tylosin tartrate가 갖는 290nm에서 최대 흡광도를 갖고 있는 것으로 미루어 conjugation이 이루어진 것으로 판단되었다.

면역된 rabbit으로부터 채혈한 항혈청을 희석하여 goat anti-rabbit IgG 즉 이차항체가 coating된 tube에 주입 반응시킨 후 효소 HRP가 표지된 tylosin tartrate 와 다시 반응시키고 HRP의 기질인 OPD와 반응시켜 OD가를 측정하였을 때 Fig 2와 같은 항체희석곡선을 얻었다. 항체가 희석됨에 따라 낮은 반응을 나타내어 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었다. 그러나 항체의 역가가 낮아 분석용으로 사용하기에는 적합치 않은 것으로 판단되었다. 이것은 면역기간이 짧았기 때문으로 여겨지고, 이를 개선하기 위해서는 항원을 계속 booster함에 따라 높은 역가의 항체를 얻을 수 있을 것으로 기대되었다.

Tylosin분석을 위한 HPLC의 조건은 ng단위에서 정확하게 standard curve를 그릴 수 있었으며 10 μ g까지는 직선상의 standard curve를 그릴 수 있었다(Fig 3). 고로 tylosin의 경우 허용한계는 0.2 ppm까지도 측정이 가능하였다. 실제 돼지의 serum을 사용해서 recovery를 조사한 결과 Table 1에서 나타낸 바와 같이 87.4 \pm 4.

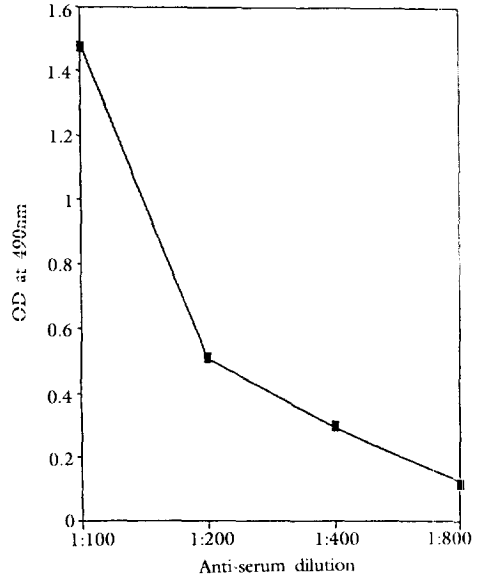


Fig 2. Titration curve of rabbit anti-tylosin serum with tylosin-HRP(1:1000).

0%로 회수율이 좋았으며, 이에 사용될 시료의 추출방법으로 충분히 tylosin양을 측정할 수 있다는 사실이 밝혀졌다.

돼지의 serum, kidney, liver와 muscle의 각 부위별로 tylosin을 측정된 결과(Table 2), liver(1/10), kidney(4/10) 및 muscle(2/10)로 탐지되었으며 허용량이 넘는 경우는 liver 1례(3690ng/g tissue), 그리고 kidney 1례(704ng/g tissue)가 각각 검출되었다.

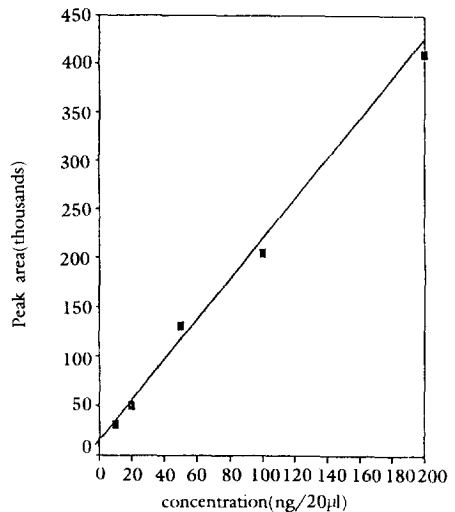


Fig 3. Tylosin standard curve by HPLC.

Table 1. Recovery of tylosin from spiked pork samples analyzed by HPLC^a

Sample	Amount added (ng/ μ l)	Amount found (ng/ μ l)	Rec(%)	Mean(%) Rec \pm SD(n)
Serum	20ng/ μ l	17.0	85	87.4 \pm 4.0(5)
	20ng/ μ l	16.8	84	
	20ng/ μ l	16.8	84	
	20ng/ μ l	18.8	94	
	20ng/ μ l	18.0	95	

a: Blood serum was obtained from random animals.

Table 2. Tylosin residues in liver, kidney and blood serum of intramuscularly injected swine samples analyzed by HPLC

Animal No	Tylosin residues			
	blood serum (ng/10ml)	Liver ^a (ng/g tissue)	kidney (ng/g tissue)	Muscle (ng/g tissue)
1	- ^b	-	-	-
2	-	-	-	-
3	-	-	-	88
4	-	-	-	192
5	-	-	-	-
6	-	-	704	-
7	-	-	84	-
8	-	-	84	-
9	-	3690	160	-
10	-	-	-	-

a: Samples are analyzed at 1 day after slaughtered.

b: Not determined.

고 찰

축산물의 잔류항생물질에 대한 연구는 선진외국에서 많이 연구되고 있고^{5,12} 우리나라에서는 1989년 5월 농림수산부 고시로 27종의 유해 잔류물질에 대한 최대 잔류허용기준 및 시험방법을 고시하였고, 1986년 12월 보사부에서는 40종의 동물약품에 잔류허용기준을 정하여 시행하기로 고시하였다¹³.

tylosin에 BSA를 conjugation하여 rabbit에 면역시켜 얻은 항혈청을 HRP가 표지된 tylosin tartrate와 반응시킨 결과 항체가 생성되었음을 확인할 수 있었으나 항체

의 역가가 낮아 분석용으로 사용하기에는 적합치 않았다. 이것은 면역기간이 짧았기 때문이라고 여겨지고, 이를 개선하기 위해서는 항원을 계속 booster함에 따라 높은 역가의 항체를 얻을 수 있을 것으로 생각된다.

HPLC로 tylosin을 측정된 결과 0.2 ppm까지 측정이 가능하였고 돼지의 serum을 사용하여 recovery를 조사한 결과 87.4 \pm 4.0%의 좋은 회수율을 나타냈는데 이와 같은 결과는 진등¹⁴이 보고한 돼지고기 시료에서 조사한 chloramphenicol의 평균회수율 80% 이상이라는 결과와 일치되는 소견이다.

돼지의 각 부위에서 tylosin을 측정된 결과 liver와

kidney의 각각 1례에서 허용량이 넘는 경우가 나타났는데 이와같은 결과에서 볼 때 앞으로 돼지뿐만 아니라 다른 축산물에서도 여러가지 항생물질의 허용기준량이 넘는 것이 있으리라고 생각되며, 이와같은 것은 공중보건상의 문제를 야기시킬 수 있으리라고 생각된다. 따라서 축산물의 안전성에 대한 좋은 분석방법 연구가 더욱 많이 개발되어 축산식품의 약제 잔류를 신속히 찾아내어, 이로 인한 피해를 최대한 줄이기를 바라는 바이다.

결 론

축산물에서 tylosin 측정을 위한 면역분석법을 개발하였고 표준방법으로 광범위하게 사용되고 있는 HPLC방법으로 tylosin의 잔류량을 조사한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 면역분석법을 개발하기 위해서 활성화된 tylosin tartrate ester 유도체와 BSA를 conjugation한 것은 tylosin tartrate가 가진 290nm에서 최대의 흡광도를 나타내서 conjugation이 이루어진 것이 확인되었다.
2. rabbit으로부터 채혈한 항혈청은 항체의 역가가 낮아 분석용으로 적합치 않았다.
3. HPLC로 tylosin의 잔류량을 분석한 결과 0.2 ppm까지 측정이 가능하였다.
4. 돼지의 혈청에서 HPLC로 tylosin의 회수율을 조사한 결과 $87.4 \pm 4.0\%$ 로 나타났다.
5. 돼지 10마리의 각 장기에서 tylosin의 잔류량을 HPLC로 측정한 결과, liver 1례(3690ng/g tissue)와 kidney 1례(704ng/g tissue)에서 허용량이 넘는 수치가 측정되었다.

참 고 문 헌

1. Booth NH, McDonald LE. Veterinary pharmacology and therapeutics 6th ed. Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1988; 839-840.
2. Kluxe RM, Waitt WP. Tylosin residue analyses in swine tissue. *J Aoac* 1971; 54(1): 112-115.
3. 조태행. 축산식품의 잔유항생물질, 한국수의공중보건학회 1978; 2(1): 56-60.
4. Kitagawa T, Ohtani W, Maeno Y, et al. Drug resi-

- due in animal tissues. *J ASSOC off Anal chem* 1986; 69: 644-646.
5. Barnes JB. General referee reports: Committee on drug and related topics. *J ASSOC off Anal Chem* 1987; 70: 268-270.
6. Onji Y, Uno M, Tanigawa K. Drug residues in animal tissues. *J ASSOC off Anal Chem* 1984; 67: 1135-1137.
7. Okada J, Kondo S. Liquid chromatographic method for determining the macrolide antibiotic sedecamycin and its major metabolites in swine plasma and Tissues. *J ASSOC off Anal Chem* 1987; 70: 818-824.
8. Neidert E, Peter W, Frank T. Drug residues in animal tissue. *J ASSOC off Anal chem* 1987; 71: 197-200.
9. Formica G, Gianonne. Gas chromatographic determination of avil amycon total residues in pig, fat, feces and urine. *J ASSOC of Anal Chem* 1986; 69: 763-766.
10. Shaikh B, Allen EH, Gridley JC. Determination of neomycin in animal tissues, using ion-pair liquid chromatography with fluorometric detection. *J ASSOC off Anal Chem* 1985; 68: 29-36.
11. Moats WA, Harris EW, Steele NC. Comparison of liquid chromatographic and bioassay procedures for determining depletion of intramuscularly injected tylosin. *J ASSOC off Anal Chem* 1985; 68: 413-416.
12. Lauridsen MG. Determination and depletion of residues of carbadox, tylosin and virginiamycin in kidney, liver and muscle of pigs in feeding experiments. *J ASSOC off Anal Chem* 1988; 71(5): 921-925.
13. 농산부고시 제89. 수육중 잔류물질 시험방법 및 허용기준. 한국축산학회 식육연구회 1989; 9(1): 43-55.
14. 진남섭, 윤화중, 이원창 등. 액체 크로마토그래피에 의한 쇠고기, 돼지고기, 닭고기 중 크로람페니콜 잔유량분석에 관한 연구. 한국수의공중보건학회지 1992; 16: 257-266.