

原乳中 微量 설파劑 檢出方法 比較에 대한 實驗的 研究

黃源武 · 李聲模 · 孫奉煥 · 李元暢*

仁川廣域市 保健環境研究院 家畜衛生試驗所
建國大學校 畜産大學 獸醫學科*

An experimental study on the comparison of trace amount of sulfonamides detection method in raw milk.

Won-Moo Hwang, Song-Mo Lee, Bong-Whan Sohn, Won-Chang Lee*

*Inchon Veterinary Service Laboratory, Kon-Kuk University**

Abstract

The sulfonamide is one of potentiative antimicrobial agents which is being used widely in veterinary medicine for control of several animal diseases such as mastitis as well as for promotion of growth. However, the misusages of sulfonamides in food producing animals, especially cattle produce several considerable problems in human health caused from residues of this antibiotic in milk product.

To determine the most effective analytical methods for residual sulfonamides in raw milk, this study was performed comparatively using by some applicable screening detecting method such as TTC, Charm II test (sulfonamides), and Lactek tests (sulfamethazine kit). The positive result from screening tests was confirmed by HPLC method. Milk samples (540 raw milks) were collected from dairy farms.

Results of this study are summarized as follows ;

1. All samples (540 raw milks) showed negative response from TTC test, however, 18 raw milks of those samples responded positively to Charm II test.
2. By Lactek test, residual sulfamethazine was detected from 4 raw milks. Fifteen raw milks of 18 samples which were classified as positive one by Charm II test, showed positive response

3. Retention time of sulfonamides added at the level of 100ppb into skim milk was ranged from 1.55 minute to 23.3 minute. Recovery rates of sulfonamides were variable from 6.7% upto 94.2% depended on the types of sulfonamide.
4. Single type of sulfonamides was detected from 10 raw milk samples, 2 types of sulfonamides from 3 samples and 3 types from 2 raw milks by HPLC.
5. Sulfonamides was detected in this study were 5 types : 11 samples for sulfisomidine, 5 samples for sulfamethazine, 3 samples for sulfadimethoxine, 2 samples for sulfathiazole and 1 sample for sulfadiazine.
6. The highest levels of residual sulfonamides was 210.3 ppb of sulfamethazine but the lowest concentration of residue was 2.2 ppb of sulfamethazine and sulfisomidine, respectively. Number of samples detected positively in this experiment were belows : above 100 ppb for 1 sample (4.5%) (sulfamethazine), 50 ~ 100 ppb for 4 samples (18.1%) (each 2 samples for sulfamethazine and sulfisomidine, respectively), 25~50ppb for 6 samples (27.1%) (2 sulfisomidine, each 1 sample for sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethazine and sulfathiazole, respectively), 10~25ppb for 3 samples (13.7%) (3 sulfisomidine), and below 10ppb for 8 samples (36.4%) (4 sulfisomidine, 2 sulfadimethoxine and each 1 for sulfamethazine and sulfathiazole).

Key words : Sulfonamide, Antibiotic in milk product, Mastitis

緒 論

現在 우리 國民의 1人當 GNP는 1만불을 넘어先進國의 문턱에 다다르게 되었다. 經濟의 成長은 바로 食生活의 變化를 招來하게 되었으며, 그 結果 肉類의 消費量과 牛乳의 消費量은 急激히 增加되었다.

牛乳의 경우 1984년에는 年間 生産量이 840,543톤 이던것이 1994년에는 1,917,398톤을 生産하였으며, 國民 1人當 消費量은 46.8Kg로 增加하였다¹⁾. 牛乳 및 乳製品의 增加는 原乳의 乳質 向上을 要求하게 되었으며, WHO/FAO등의 國際機構의 등장으로 國際 競爭力 向上을 위해서는 信賴 할 수 있는 原乳의 生産이 時急하다고 할 수 있다. 牛乳는 다른 어떤 食品보다 腐敗되기 쉽고, 人獸共通 傳染病의 媒介役割을 하여 牛乳의 衛生的 生産은 항상 重要視되어 왔다. 젖소의 疾病豫 防및 治療와 生産性의 向上을 위하여 抗菌性 物質이 使用되었으나, 誤·濫用으로 그 殘留問題가 公衆保健上 重要한 關心事로 擡頭되었다^{2~4)}.

1935년 獨逸의 Domagk, Gerhard씨가 溶血性 連鎖狀球菌 治療에 Prontosil이 效果가 있음을

發表하였으며 그 以後에 Prontosil이 體內에서 sulfanilamide로 代謝 되어 抗菌作用을 나타낸다는 것이 證明되었다. 이로써 sulfanilamide가 最初의 化學療法劑로 등장하였고, 보다 강력한 殺菌效果를 가진 여러 種類의 sulfanilamide 誘導體가 開發되어 細菌性 疾病의 治療와 豫防의 目的으로 使用되었다^{5,6)}. 그중 일부는 家畜의 臨床이나 食用動物의 成長促進 目的으로도 널리 이용 되었다⁶⁾. 젖소의 경우 全身 感染症이나 乳房 軟膏劑로 무차별하게 使用되어 牛乳에 殘留 우려가 있으며, 既存 TTC(2, 3, 5-Triphenyl-2, 1, 3, 4, -Tetrazolium- Chloride reduction test) 試驗法은 설과劑에 대해 10ppm 濃度이하는 檢出되지 않아 抗生劑의 殘留問題를 惹起 시킬 수 있다는 指摘이다^{7~10)}.

牛乳中에 殘留된 설과劑는 人體에 副作用이 극히 輕微하다는 일부學者들의 主張도 있지만¹¹⁾ 濫用時에는 腎臟障 碍, 造血臟器 異常, 過敏反應, 關節炎, 甲狀腺 機能不全, 免疫系 異常등의 副作用을 일으킬 수 있기 때문에 世界 各國에서는 설과劑 및 抗生劑 誤·濫用을 줄이기 위하여 最大許容限界(maximum residue limits, MRLS)를 設定하였다^{5~12)}.

既存 國內의 牛乳中 細菌發育 抑制物質 檢査法으로 1979년부터 適用된 TTC 試驗法은 설과劑의 경우 그 檢出 感도가 顯著히 낮아, 최근 TTC II 법으로 개정고시되어 1996년 8월 1일부터 적용되었다¹³⁾. 이미 先進國에서는 食品의 安全性과 高品質의 牛乳를 生産하기 위하여 最新 分析技法이 普及되었다. 그중 感도가 높고 實驗이 簡單하며, 檢出時間이 짧은 Lactek test (Enzyme immuno assay ; EIA)^{14~16)}나 Charm test(microbial receptor assay)^{15~20)} 등이 개발 報告되어 國際的(AOAC)인 公認을 받았다. 그러나 이런 方法들은 迅速하고 빠르게 sulfamethazine 등 個別的인 殘留 설과劑를 screening 하기는 適合하나, 여러 種類의 殘留 설과劑의 同時分析에는 適合하지 않다. 이 方法들의 補完 및 各種 설과劑를 分別 定量하기 위하여 GC, GC/MS 등이 確認 定量法으로 開發되어 使用되고 있다^{21~25)}.

이들 方法들은 各各의 설과劑의 定量 檢査時 매우 正確하나 그 前處理가 複雜하며 同時에 여러 種類의 설과劑 分析은 어려운 實情이다. 그러나 HPLC法은 前處理 과정이 쉽고 回收率과 正確性, 再現性이 뛰어나 여러 나라에서 公認 檢査法으로 應用되고 있다^{26~30)}.

既存 우리 나라의 細菌發育 抑制物質 檢査法인 TTC 試驗法은 설과劑 檢出이 미흡하여 畜産物 安定性 確保가 어려워 國民 保健上 問題가 惹起될 소지를 안고 있어 그 補完 對策으로 Charm II test(microbial receptor assay ; sulfonamides)와 Lactek test(enzyme immunoassay ; sulfamethazine) 그리고 HPLC를 이용하여 牧場 原乳의 比較 檢査를 實施하여, 앞으로 적절한 檢査法 및 基準 마련과 農家 指導 資料를 얻고자 本 實驗을 試圖 實施 하였다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

540개 牧場의 原乳를 50ml씩 채취하여 冷藏 狀態로 實驗室에 운반하여 實驗에 供하였다.

2. 實驗方法

1次로 TTC色素 還元試驗과 Charm II test를 實施하였으며, Charm II test 陽性試料에 한해 -20℃ 冷凍保管 하여 Lactek test 및 HPLC로 定量分析을 實施하였다.

1) TTC색소 還元試驗(TTC test).

農林水産部 告示 第1993-13號에 依한 畜産物 試驗 方法에 의해 實施하였다⁸⁾. (Fig 1)

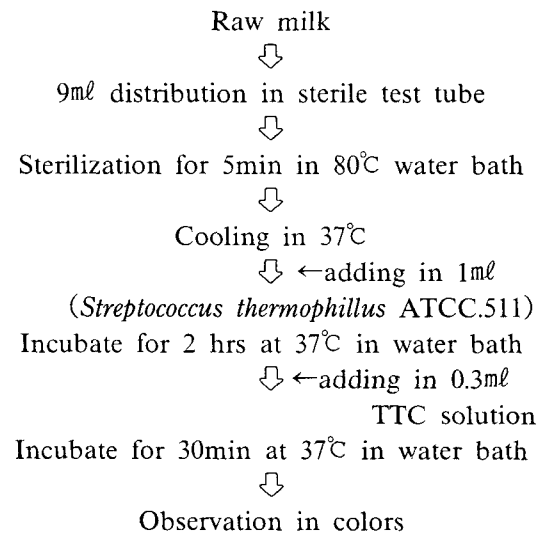


Fig 1. Flow diagram for TTC test in raw milk

2) Charm II test

가. 原理

Charm test는 微生物 受容體 分析法으로서 受容體 試藥이 添加될 때 試料에 汚染된 抗菌物質은 微生物 受容體와 結合하여, [¹⁴C] 또는 [³H]가 標識된 抗菌物質이 受容體에 結合되는 것을 妨害한다. 따라서 [¹⁴C] 또는 [³H]로 標識된 抗菌物質이 受容體에 많이 結合하면 할수록 試料中에는 抗菌物質이 殘留하지 않는 結果가 된다^{15,16)}.

나. 實驗材料

Test tube, scintillation fluid, tablet reagents (pink : markedsulfa, white : binding reagent), positive control standard, zero control standard, 원심분리기, 피펫, 증류수, 면봉, 타이어, 원심분리관(50ml).

다. 實驗方法

Charm sciences社에서 製造한 Charm II 7600 system을 利用하였다.(Fig 2)

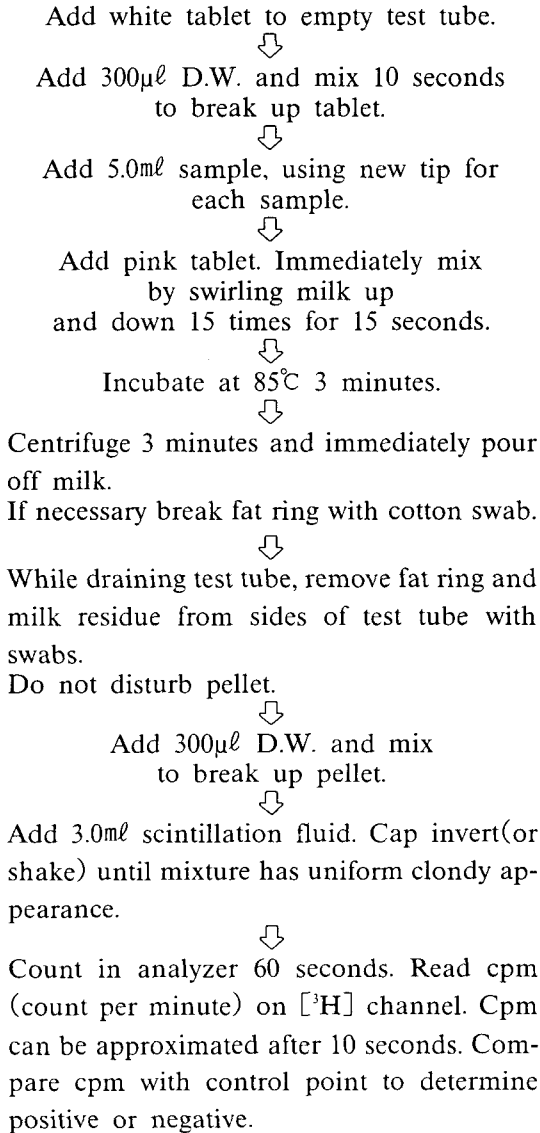


Fig 2. Flow diagram for Charm II test in raw milk

3) Lactek test(Sulfamethazine)

가. 原理

Enzyme을 使用한 immunoassay 方法으로서 牛乳 試料中の 殘留抗茵物質이 試驗管의 内部에

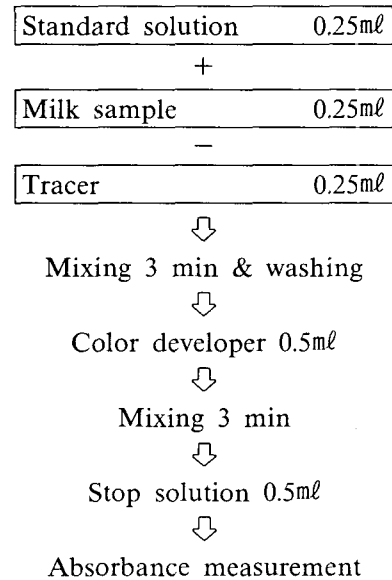
부착된 抗體와 反應을 하고, 나머지 部分만이 酵素와 結合하므로 發色液 添加時 色變化가 적어서 陽性으로 判別된다^{1,9,36)}.

나. Lactek test kit

: Antibody coated tubes, Standard(liquid), Tracer and Diluent, Stop solution, Wash solution, Color developer.

다. 實驗方法

: Idetek社에서 製造한 Lactek system을 使用하였다(Fig 3).



Result : (+)O.D. of the sample < O.D. of standard
 (-)O.D. of the sample > O.D. of standard

* O.D. : Optical density

Fig 3. Flow diagram for Lactek test in raw milk

4) HPLC(high performance liquid chromatography)

가. 實驗器具(Apparatus)

A. Liquid chromatography

- Pump(P4000) : spectra - physics

- UV/Vis detector : spectra - physics

- Integrator : spectra- physics datajet
- B. Evaporator : Turbo Vat(Zymark)
- C. Microfilter system(Millipore)
- D. Vortex mixer(Charm Sci.)
- E. Column : Nava-pak C18(3.9mm×150 mm, 4μm)
- F. Separatory funnel
- G. Acrodisc : 직경 0.45μm)
- H. Ultrasonic cleaner(Bransonic)

- 나. 試藥(Reagent)
- A. Distilled water : LC grade, J.T Baker
 - B. Solvents(HPLC grade, J.T Baker)
 - : acetonitrile
 - methanol
 - methylen chloride
 - C. Reagent : KH₂PO₄(GR, Junsei), H₃PO₄(GR, Junsei)
 - D. Sulfonamide standards(Sigma)
 - : Sulfachloropyridazine(SCP), Sulfadiazine(SDZ), Sulfadimethoxine(SDM), Sulfamerazine(SMR), Sulfamethazine(SMT), Sulfamethoxypridazine(SMP), Sulfamonomethoxine(SMM), Sulfaquinoxaline(SQX), Sulfathiazole(STZ), Sulfisomidine(SSD), Sulfisoxazole(SSZ), Sulfanilamide(SNM).

다. 溶液의 製造

- A. 이동상 溶液(Mobile phase)
 - : Potassium phosphate(KH₂PO₄) 1g을 蒸溜水 1ℓ에 녹여 0.1 KH₂PO₄溶液을 만든 후 이 용액 840ml와 acetonitrile 160ml를 混合하였다. phosphoric acid (H₃PO₄)로 pH가 3.5가 되게 조정하고 microfilter system을 利用 0.45μm 필터로 濾過하여 이동상 溶媒로 使用하였다.
- B. 試劑 標準溶液
 - Stock solution(100μm) : 각 試劑 10 mg을 正確하게 달아 100ml용량 플라스크에 취한 다음 메탄올로 溶解하여 100 ml가 되도록 한 다음 冷蔵 保管하였다.
 - Intermediate solution(1μℓ) : stock so-

lution 1ml를 100ml 用量 플라스크에 취하여 이동상 溶媒로 稀釋하여 100ml가 되도록 하여 使用하였다.

- Working solution : 각 intermediate solution 일정량을 취하여 이동상 溶媒로 2배(500ng/ml), 10배(100ng/ml), 20배(50ng/ml)로 稀釋하여 使用하였다.

C. HPLC 分析條件

- : 本 實驗에서의 HPLC 分析 條件은 다음과 같다
- Column : Nova-pak C₁₈ (3.9mm×150 mm, 4μm)
- Wave length : 270nm
- Absorbance unit full scale(AUFS) : 0.005
- Flow rate : 1.0ml/min
- Attenuation : 8
- Chart speed : 0.5cm/min
- Injection volume : 50μℓ
- Mobile phase : Potassium phosphate (1g/ℓ) : Acetonitrile(840 : 160, V/V pH 3.5 ; V : Volume)

D. 回收率 豫備試驗

: 牧場의 原乳를 Charm II test로 檢査하여 陰性 試料임을 確認한 후 다음과 같이 각 試劑를 100ng/ml로 添加하여 Fig 4 의 方法으로 前處理를 한 후 回收率을 求하였다.

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{試料에서 回收된 試劑量}}{\text{試料에 添加된 試劑量}} \times 100$$

$$= \frac{\text{試料溶液 peak area} \times \text{標準溶液의 濃度} \times \text{最終稀釋量(1)}}{\text{標準溶液의 peak area} \times \text{試料量(10g)}}$$

- Take 20ml of methylen chloride into a separatory funnel(I)
 - ⇩←Add 10ml milk sample.
 - ⒶShake 2-3 times.
 - ⇩←ⒷOpen plug and vent gas.
 - ⒸClose plug and shake 2-3 times.

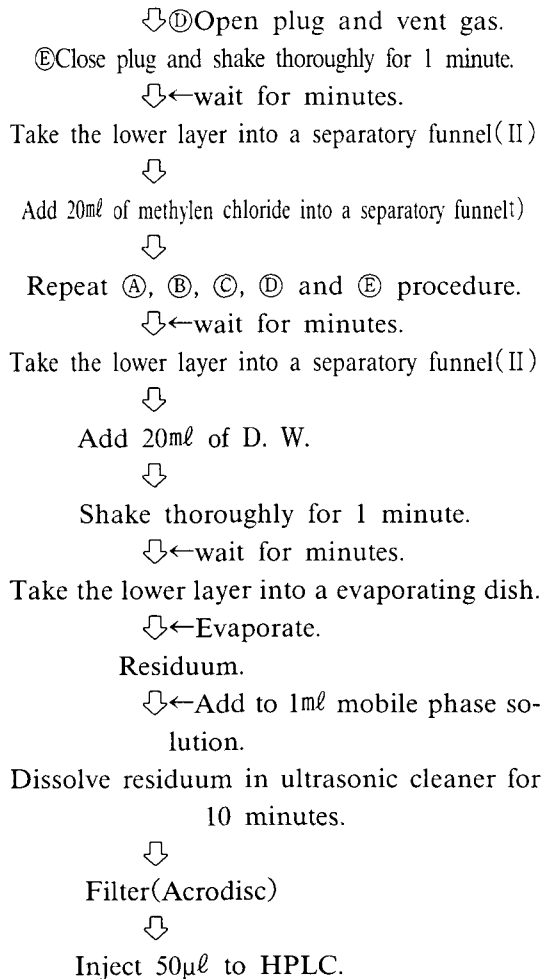


Fig 4. Flow diagram for HPLC procedure for the residual sulfonamides in raw milk.

結 果

1. TTC test, Charm II test, Lactek test, HPLC法에 의한 설파劑 檢査 成績

540件的 牧場原乳에 대하여 TTC test, Charm II test, Lactek test, HPLC法으로 설파劑 殘留 檢査를 實施한 結果 TTC test은 全量 陰性이 었으며, Charm II test에서 18農家(3.3%)가 檢出되었다. 檢出된 18農家에 대하여 Lactek test로 比較 檢査한 結果 4件이 SMT 陽性이 었으며, HPLC法으로 定量 檢査한 結果 15農 家에서 설파劑가 檢出되었다(Table 1).

Table 1. Comparison of analytical methods for detecting residual sulfonamides in raw milk

Number of tested sample	Analytical method			
	TTC test	Charm II test	Lactek* test	HPLC* test
540	—	18(3.3%)	4	15

TTC : 2,3,5 -Triphenyl- 2,1,3,4 -Tetrazolium-Chloride reduction test

Charm II test : Total sulfonamides

Lactek test : Sulfamethazine only

HPLC : High performance liquid chromatography

* : Test for suspect samples of Charm II test

2. Charm II test와 Lactek test의 比較

Charm II test의 경우 각 試藥의 새로운 lot에 대하여 control point (C.P.), zero, positive average (Pos. AVG.)를 새로 測定하여 精査하여야 한다. 本 實驗에서 zero 값은 zero control standard milk

Powder(free sulfonamide)를 復原시켜 3번 檢査한 平均測定값이며, Pos. AVG.는 positive control standard(sulfamethazine 10ppb)를 復原시켜 6번 檢査한 平均 測定값이다.

C.P.란 試料中에 抗菌物質이 汚染되었는지를 決定하기 위해 使用되는 數値로서 Pos. AVG. 값에 각 抗菌物質 系列의 偏差를 더한 것이다. 陰性試料는 C.P.보다 測定값이 높게 나타나고, suspect試料는 C.P.보다 測定값이 낮게 나타난다. 本 實驗에서도 Pos. AVG. 값에 설파劑의 偏差인 15%의 값을 더하여 C.P.값을 定하였다. Lactek test의 경우 1번의 實驗에서 5-6개 程度의 試料를 檢査할 수 있는데 standard를 매번 實驗 할 때 試料와 같이 檢査하여 standard의 O.D.값보다 試料의 O.D.값이 낮을 경우에 陽性으로 判定된다. Charm II test의 경우 總 540 件的 試料에서 18件的 suspect試料가 檢出되었다. 檢出된 試料中 最大 測定값은 546, 最小

Table 2. Comparison of analytical methods between Charm II test(suspect samples) and Lactek test for detecting residual sulfonamides in raw milk

Sample	Analytical method							
	Charm II test (Sulfonamide)			Lactek test (Sulfamethazine)				
	Pos AVG	CP	Zero	Sample	Result	Standard	Sample	Result
52	963	1107	2487	746	Suspect	0.423	0.544	-
53	963	1107	2487	654	Suspect	0.423	0.427	-
54	963	1107	2487	748	Suspect	0.423	0.553	-
56	963	1107	2487	679	Suspect	0.423	0.493	-
57	963	1107	2487	790	Suspect	0.423	0.185	+
58	963	1107	2487	667	Suspect	0.519	0.600	-
59	963	1107	2487	702	Suspect	0.519	0.115	+
60	963	1107	2487	875	Suspect	0.519	0.633	-
61	963	1107	2487	676	Suspect	0.519	0.091	+
62	963	1107	2487	591	Suspect	0.591	0.615	-
63	963	1107	2487	629	Suspect	0.518	0.593	-
64	963	1107	2487	546	Suspect	0.526	0.153	+
65	963	1107	2487	1075	Suspect	0.526	0.756	-
66	963	1107	2487	754	Suspect	0.526	0.730	-
67	963	1107	2487	621	Suspect	0.501	0.664	-
68	963	1107	2487	912	Suspect	0.501	0.755	-
69	963	1107	2487	762	Suspect	0.501	0.671	-
70	963	1107	2487	681	Suspect	0.501	0.588	-

Pos AVG : Positive average(10 ppb), CP : Control point(Pos AVG×1.15), Zero : Free sulfonamide

測定값은 1075로 나타났다. Lactek test에서 양성으로 나타난 4건의 경우에는 最大 測定값(O.D.)이 0.091이었으며, 最小 測定값(O.D.)이 0.185로 나타났다(Table 2).

3. 回收率 試驗 및 크로마토그램의 作成

설파제(가)가 檢出되지 않은 牛乳에 sulfanilamide(SNM), sulfisomidine(SSD), sulfadiazine(SDZ), sulfathiazole(STZ), sulfamerazine(SMR), sulfamethazine(SMT), sulfamethoxypyridazine(SMP), sulfamonomethoxine(SMM), sulfachloropyridazine(SCP), sulfisoxazole(SSZ), sulfadimethoxine(SDM), sulfaquinolaxine(SQX)의 12가지 설파제를 100ppb의 濃度로 混合 添加하여 Fig 4와 같은 方法으로 抽出 및 錠劑한 후 HPLC로 檢査하여 回收率을 求하

였던 바 Table 3 및 Fig 6과 같았다. 即, SQX, SNM, SSZ, STZ, SSD는 各各 6.7%, 9.8%, 16.7%, 17.0%, 19.3%로 낮게 나타났으며, SMR, SMP, SMT, SMM 는 各各 94.2%, 87.3%, 86.0%, 77.4%로 比較的 높은 回收率을 보였다. Fig. 5는 上記 12가지 설파제의 標準溶液을 50ppb로 HPLC에 50 μ l 注入하여 얻은 Chromatogram이다. 12가지 설파제 各各의 溶出時間은 1.55分~23.31分으로 나타났다(Fig 5, Fig 6).

4. 18個 試料에 대한 Lactek test와 HPLC法의 比較

Lactek test 陽性 4건에 대하여 HPLC 定量 檢査 結果 SMT이 모두 檢出되었으며, Lactek test로 檢出되지 않았던 66번 試料에서도 SMT가 檢出 되었다. 그러나 66번 試料는 Lactek

Table 3. Recovery data for 12 sulfonamides in raw milk fortified at 100 ppb

Sulfonamide	Retention time(min)	Recovery	
		*Mean(%)±	**CV(%)
SNM	1.55	9.8±	0.3
SSD	2.04	19.3±	1.7
SDZ	2.38	67.8±	3.3
STZ	2.61	17.0±	1.2
SMR	3.12	94.2±	3.5
SMT	3.94	86.0±	5.4
SMP	4.48	87.3±	15.8
SMM	6.38	77.4±	4.1
SCP	7.11	44.7±	2.9
SSZ	11.74	16.7±	3.4
SDM	21.02	53.0±	8.7
SQX	23.31	6.7±	2.4

*Averages of 3 analysis

**CV : Coefficient of variation

SNM : Sulfanilamide

SSD : Sulfisomidine

SDZ : Sulfadiazine

STZ : Sulfathiazole

SMR : Sulfamerazine

SMT : Sulfamethazine

SMP : Sulfamethoxyypyridazine

SSZ : Sulfisoxazole

SMM : Sulfamonomethoxine

SDM : Sulfadimethoxine

SCP : Sulfachloropyridazine

SQX : Sulfaquinolaxine

test의 檢出限界인 10ppb에 훨씬 못 미치는 2.2 ppb로 나타났다.

또한, HPLC 定量 檢査 結果 檢出劑는 모두 15農家에서 5種 22件이 檢出되었다(Table 4).

5. HPLC法에 의한 檢出劑 檢出

HPLC로 18農家 試料를 定量 檢査한 結果 15 農家에서 檢出劑가 檢出되었는데, SSD는 11件,

SMT 5件, SDM 3件, STZ 2件, SDZ 1件으로 總 22件이 檢出되었다. 單一 檢出劑 最低 檢出量은 SSD, SMT가 2.2ppb이었으며, 最大 檢出量은 SMT에서 210.3ppb이었다. 單一 試料의 檢出劑 總量에서는 最低 檢出量이 試料 52번에서 2.2ppb이었으며, 最大 檢出量은 試料 61번에서 290.8ppb를 나타내었다(Table 5).

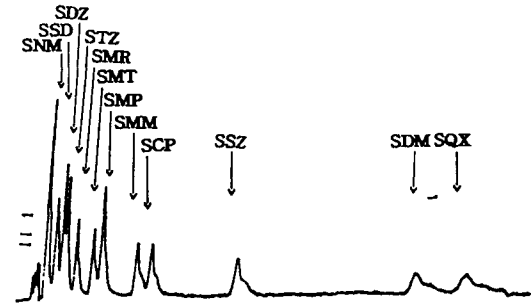


Fig 5. Chromatograms showing the peak separation of 12 sulfonamide standards
Flow rate : 1ml/min, Wave length : 270nm, AUFS : 0.005 Mobile phase : Potassium phosphate(1g/l)/Acetonitrile(pH 3.5, 840/160, V/V)

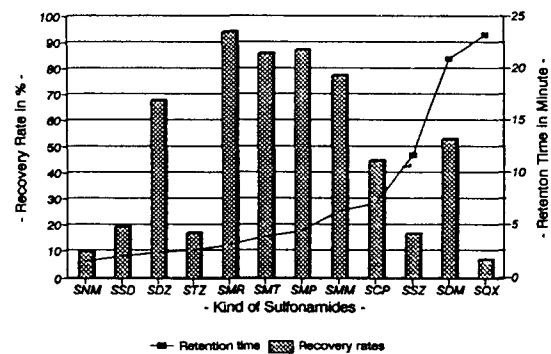


Fig 6. Comparison of recovery rater and reterntion time of sulfonamides in milk

6. HPLC法에 의한 濃度別 檢出

22件에 대한 檢出劑 檢出量은 100ppb以上이 1件(4.5% - SMT), 50~100ppb가 4件(18.1% - SSD, SMT 各各 2件), 25~50ppb가 6件(27.1

% - SSD 2件, SMT, SDM, STZ, SDZ 各各 1件), 10~25ppb가 3件(13.7\ - SSD 3件), 10 ppb未滿이 8件(36.4% - SSD 4件, SDM 2件, SMT, STZ 各各 1件) 이 檢出되었다(Table 6).

Table 4. Comparison between Lactek test and HPLC for detecting residual sulfonamides in 18 raw milk

Sample	Method		
	Lactek test (only SMT)	Detect	HPLC Sulfonamides
Total	4	15	22
52	Negative	+	SSD
53	Negative	+	SSD
54	Negative	N.D.	
56	Negative	+	SSD
57	Positive	+	SMT
58	Negative	+	SSD
59	Positive	+	SMT,SDM
60	Negative	N.D.	
61	Positive	+	SMT,SDM,SSD
62	Negative	+	SSD
63	Negative	+	SSD
64	Positive	1	SMT,SSD
65	Negative	N.D.	
66	Negative	+	SMT,SSD
67	Negative	+	SDM
68	Negative	+	SSD
69	Negative	+	STZ
70	Negative	+	STZ,SDZ,SSD

HPLC : High performance liquid chromatography

N.D. : Not detected

SSD : Sulfisomidine

SMT : Sulfamethazine

SDM : Sulfadimethoxine

STZ : Sulfathiazole

SDZ : Sulfadiazine

Table 5. Results of determination of sulfonamides in raw milk by HPLC

Sample	Sulfonamides(ng/ml)					Total (ng/ml)
	SSD	SMT	SDM	STZ	SDZ	
52	2.2	/	/	/	/	1(2.2)
53	32.5	/	/	/	/	1(32.5)
54	/	/	/	/	/	N.D.
56	18.7	/	/	/	/	1(18.7)
57	/	36.4	/	/	/	1(36.4)
58	3.2	/	/	/	/	1(3.2)
59	/	91.2	8.8	/	/	2(100.0)
60	/	/	/	/	/	N.D.
61	74.5	210.3	6.0	/	/	3(290.8)
62	51.4	/	/	/	/	1(51.4)
63	26.2	/	/	/	/	1(26.2)
64	12.8	59.6	/	/	/	2(72.4)
65	/	/	/	/	/	N.D.
66	6.3	2.2	/	/	/	2(8.5)
67	/	/	32.5	/	/	1(32.5)
68	8.8	/	/	/	/	1(8.8)
69	/	/	/	3.2	/	1(3.2)
70	16.9	/	/	39.6	39.7	3(96.2)
Total	11	5	3	2	1	22

HPLC : High performance liquid chromatography

N.D. : Not detected

Table 6. Detected number of residual sulfonamides by concentration(HPLC analysis).

Sulfonamides	Concentration(ppb)					
	Total	<10	10~25	25~50	50~100	>100
Total	22	8	3	6	4	1
SSD	11	4	3	2	2	-
SMT	5	1	-	1	2	1
SDM	3	2	-	1	-	-
STZ	2	1	-	1	-	-
SDZ	1	-	-	1	-	-

7. 複合설파劑 檢出

單一설파劑 檢出은 SSD가 7件으로 가장 많았고 STZ, SDM, SMT가 각각 1件이 檢出되었다.

2種의 混合檢出은 SMT·SSD이 2件, SMT·SDM이 1件으로 나타났으며, 3種의 混合檢出은 SSD·STZ·SDZ이 1件, SSD·SDM·SMT이 1件으로 나타났다(Table 7).

Table 7. The number of detected sulfonamide according to mixed type in 15 raw milk.

	Sulfonamides	Number	Total
	Total		15
Single	SSD	7	
	STZ	1	
	SDM	1	10
	SMT	1	
Double	SMT,SSD	2	3
	SMT,SDM	1	
Triple	SSD,STZ,SDZ	1	2
	SSD,SDM,SMT	1	

考 察

우리 나라의 경우 國土가 좁고 平野가 적어 酪農國家로는 適合하지 않으며, 小規模의 酪農牧場이 大部分이다. 이런 條件에서 家畜의 飼料效率 增進과 成長 促進의 補助劑 및 細菌性 疾病의 治療와 豫防의 目的으로 合成 抗菌劑가 相當量 使用되는 것이 現實이다.

우리 나라에서 1994년 소의 乳房炎 治療劑의 販賣 現況을 살펴보면 國產 및 輸入藥劑(抗生物質製劑, 抗菌物質製劑, 其他)가 45億3700萬원(1907.85kg)이 販賣되었다^{31,32)}. 國內 乳房炎 治療劑로 販賣되는 설파劑의 販賣 金額은 '94년의 경우 sulfisomidine性分製劑 (8億餘원), sulfamethazine性分製劑 (4億餘원), sulfisomidine, sulfamerazine, sulfathiazole 混合製劑 (2億餘원)의 順으로 報告 되었다^{31,32)}.

本 實驗에서는 HPLC 定量 結果 sulfisomi-

dine 11件, sulfamerazine 5件, sulfadimethoxine 3件, sulfathiazole 2件등의 順으로 檢出되었는데 이러한 檢出 結果는 위의 國內 乳房炎 治療劑 販賣 實績과 聯關性을 갖는 것으로 思料된다.

또한 本 實驗에서 540農家를 調査하여 18農家에서 설파劑가 檢出되어 3.3%의 檢出率을 보였는데, 이것은 캐나다³³⁾에서 1990년 10個都市의 sulfamethazine 檢出 結果(檢出限界 5 ppb)에서 6.7%의 檢出率을 보인 것과 比較시 낮은 檢出率을 보였다. 캐나다의 경우는 5.4 ppb~11.4ppb의 낮은 濃度를 보였고 本 實驗에서는 2.2ppb~210.3ppb까지의 높은 濃度를 나타내었으나, 이것은 캐나다의 경우 市乳를 檢査하였고 本 實驗에서는 牧場別 原乳를 檢査하였기 때문으로 생각된다.

이와 類似한 報告로 Bady와 Katz³³⁾는 뉴욕 地域에서 市乳의 40%³³⁾에 sulfonamides가 12.5 ppb以上 含有되어 있다고 하였다.

食肉의 경우 1992년 Idexx Inc社의 美國내 설파劑 殘留檢査 資料³⁴⁾에 의하면 3,719試料 檢査結果 106個가 檢出(檢出限界 10ppb)되었는데, sulfamethazine이 77件, sulfadimethoxine 15件, sulfathiazole 11件, sulfapyridine 2件, sulfadiazine 1件이었다. 1986년 FSIS(Food Safety and Inspection Service; 美國農務省의 食品安全檢査國)資料에 依하면 설파劑 10種을 各 1種마다 4,963件씩 總 49,630件 檢査結果 108件(0.218%)이 檢出되었는데, sulfamethazine 78건(1.57%), sulfaquinolaxaline이 8件(0.161%), sulfathiazole 2件(0.040%), sulfadiazine 1件(0.020%)로 報告 하였다¹⁴⁾. 우리 나라의 경우 1994년~1995년의 輸入 豚肉에서 설파劑의 경우 sulfamethazine의 殘留로 인해 返送되었다³⁵⁾. 위의 자료와 같이 外國의 경우는 sulfamethazine의 殘留가 가장 問題視되는 것으로 나타났다.

Idexx Inc社에 依한 Lactek test (sulfamethazine test kit)의 sensitivity는 10ppb로 알려져 있으나^{16,36)} 一部 資料¹⁴⁾에 依하면 5ppb 濃度까지 Sensitivity를 높일 수 있다고 하였다. 本 實驗에서도 1個의 試料가 HPLC에서 sulfa-

methazine이 검출된 반면 Lactek test에서는陰性으로判定되었으나, 이것은 Lactek test의檢出感도에 훨씬 못 미치는 2.2ppb水準이었다.本實驗結果를 볼때 HPLC 定量結果 여러個의試料에서 sulfisomidine 51.4ppb, sulfadiazine 37.7ppb, sulfathiazole 39.6ppb가高濃度로檢出되었으나, Lactek test (sulfamethazine kit)에서는陰性으로判定되어 Lactek test(sulfamethazine kit)는 sulfamethazine에限하여檢出됨을알수있었다.現在原乳中抗菌性物質의檢査法으로實驗이簡單하면서迅速성이있고同時에 많은量의試料를處理할수있으며,時間的·經濟的으로適合한 TTC test나 disc assay法 같은生物學的方法이 주로使用되고 있다^{16,37,38)}.

TTC test의 경우 설과劑에 대한檢出感도를조³⁸⁾는 sulfamethazine, sulfadiazine, sulfaquinoxaline, sulfachloropyridazine가 500~5000 ppm 농도 이상이 함유 되어야檢出되며, 金³⁷⁾은 sulfamethazine의 경우 3000ppm이상의 농도에서檢出된다고 보고하였다. 조나 金에서報告하듯이 TTC test에서는 설과劑의檢出感도가 매우 낮은 실정이다.

Delvo test는微生物作用還元法으로서 β-lactams계는 penicillin G의 경우 4ppb까지檢出感도를 갖는다. Delvo test P의 경우 50~100 ppm, Delvo test SP의 경우 0.25~1.0ppm의 설과劑檢出感도를 갖고 있다. 그러나牛乳에消毒劑, 洗劑의混入(100ppm以上)시 false positive結果가發生할 가능성도 있다^{15,16,39)}.

Penzyme method는 β-lactams系 抗生劑(penicillin, ampicilline)을 酵素에 의해 신속하게檢出 해내는 比色 分析法으로서 penicillin-G의 경우 0.017 IU濃度에서 陽性を 나타낸다^{15,16)}.

Charm II test의 경우 Zomer는 sulfamethazine은 10.5ppb에서 100%, sulfadimethoxine은 4.5ppb에서 90%, sulfathiazole은 10.6ppb에서 80%, sulfadiazine은 5.75ppb에서 100%의檢出感도를 보였다고報告 하였다²⁰⁾. Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD)資料에 의하면 sulfamethazine 5ppb, sulfadimethoxine 5ppb, sulfadiazine 5ppb, sulfapyridazine 12ppb,

sulfamerazine 5ppb, sulfachloropyridazine 1 ppb, sulfathiazole 5ppb, sulfamethazole 5ppb, sulfanilamide 25ppb 등牛乳에서大部分 설과劑의 Charm II test檢出感도를 5ppb程度로發表하였다³⁶⁾.

Charm II test의 경우 tetracyclines系와 macrorides系, aminoglycosides系, β-lactams系, 설과劑등의定性分析은可能하나個別藥劑檢査(설과劑의 경우 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, sulfaquinoxaline)가 어렵고, 다른檢査法에比하여檢査單價가 높다는 점에 有意해야 한다^{15,17,18~20)}.

TLC(thin-layer chromatography)法은分離能이 좋고 展開時間이 짧아一時에 많은數의試料를簡便하고迅速하게 screening하는데는利用할수있으나個別分析은어렵다^{40~45)}.

GC, GC/MS등에 의한 分析法은 現在 널리使用되고 있으며, 單一成分을定性定量하는데는 매우正確하나前處理가複雜하며同時에多成分을分析할수있는方法은 아직國內에서實用化되지 않은實情으로 HPLC法이 많이研究·利用되고 있다^{23,28,46~54)}.

世界各國의 설과劑 및 合成 抗菌劑등의最大許容限界(maximum residue limits; MRLS)는 유럽經濟共同體 國家들의 경우 설과劑의總殘留許容量을 0.1ppm으로規程하였고^{39,55,56)} FAO/WHO(Codex Alimentarius Commission; CAC)에서는牛乳의 경우 sulfamethazine은 0.025ppm으로 그殘留許容量을規制했으며, 肉類는全畜種에서 0.1ppm으로制限하고 있다^{57~59)}. 美國 FDA의 경우 殘留基準을法的 구속력을 갖고 있는 殘留許容濃度(tolerance)와 農家指導基準인 安全水準(safe level)으로區分하고 있다.牛乳에서 殘留許容濃度(tolerance)는 sulfadimethoxine을 10ppb로制限하였고, 安全水準(safe level)에서는 sulfamethazine外 8種의 설과劑를 10ppb로定하였다^{36,60~62)}.

우리 나라의 경우 肉類에서 sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamonomethoxine, sulfaquinoxaline에 대한許容限界를 0.1ppm水準으로定하였고⁶³⁾,牛乳에서는

최근 그 許容 限界 設定을 추진하고 있다.

HPLC 分析法의 前處理 方法은 Liquid-Liquid extraction(= solvent extraction; 液狀-液狀抽出), Solid phase extraction(固狀 液狀抽出), MSPD(Matrix Solid Phase Dispersion; 試料 固體狀 分散 抽出法)등이 主要 利用되고 있다.

MSPD법에 의한 설과劑 抽出時 황등⁵³⁾은 sulfamonomethoxine 78.5%, sulfamerazine 90.0%, sulfamethazine 89.2%, sulfaquinolaxine 91.0%, sulfadimethoxine 90.8%의 回收率을 나타냈고, 박등⁵⁰⁾은 sulfamethazine 78.1%의 回收率을 나타냈다. Smedley 등⁴⁷⁾의 extraction sol을 利用 抽出한 前 處理 方法에서는 sulfamethazine 83.3%, sulfamerazine 80.5%, sulfadimethoxine 70.2%, sulfaquinolaxine 55.6%의 平均 回收率을 나타냈으며, chloroform을 利用하여 抽出한 심등⁵⁰⁾은 20ppb에서 sulfanilamide 58.2%, sulfathiazole 92.7%, sulfamerazine 86.9%, sulfamethazine 95.1%, sulfamonomethoxine 65.2%, sulfaquinolaxine 72.7%, sulfadimethoxine 86.5% 등의 回收率을 나타냈다. Methylene chloride를 利用 抽出한 本 實驗에서는 sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamonomethoxine, sulfamethoxy pyridazine, 등의 抽出時 94.2~77.0% 이상의 높은 回收率을 보인 反面 sulfisomidine, sulfathiazole, sulfisoxazole, sulfaquinolaxine, sulfanilamide 등은 19.3~6.7%의 낮은 回收率을 나타내어 sulfisomidine, sulfathiazole, sulfisoxazole, sulfaquinolaxine, sulfanilamide 등의 설과劑 抽出을 위해서는 더 많은 研究가 必要할 것으로 사료된다.

以上の 實驗 結果에서 설과劑가 極微量 檢出되었으나 우리나라 現行法上 問題는 되지 않는다. 그러나 앞으로의 基準設定을 위한 方法으로 實驗해 본 것이다. 우리나라의 畜産業이 살아남기 위해서는 좀 더 깨끗한 高品質의 牛乳를 生産해야 할 것이다. 生産主體인 牧場에서 가능한 한 抗菌劑를 使用하지 않고, 使用하더라도 休藥期間 및 藥劑의 使用法을 철저히 지키고, 乳業體에서도 더욱 精密히 檢査할 수 있도록 최선의 方法을 講究하여야 하겠다.

結 論

설과劑는 乳房炎이나 기타 治療 및 成長促進 目的으로 널리 利用되고 있다. 그러나 젖소에 서의 설과劑 誤·濫用은 原乳內 抗菌物質 殘留를 招來하여 公衆保健學적으로 여러 問題點을 나타내고 있다. 이에 牧場 原乳에 殘留되는 설과劑의 調查를 위하여 540個 牧場原乳를 TTC test, Charm II test (sulfonamides), Lactek test (sulfamethazine kit) 및 HPLC로 比較試驗하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

- 1) 總 540 農家의 原乳를 檢査한 結果, TTC test 에서 全量 陰性, Charm II test 는 18農家(3.3%)에서 설과劑가 檢出되었다.
- 2) Charm II test 檢出試料에 限하여 Lactek test 및 HPLC 檢査結果 Lactek test 는 4農家에서 sulfamethazine이 檢出되었고, HPLC는 15農家에서 설과劑가 檢出되었다.
- 3) sulfanilamide, sulfisomidine, sulfadiazine, sulfathiazole, sulfadimethoxine, sulfamerazine, sulfamethazine, sulfamethoxy pyridazine, sulfamonomethoxine, sulfachloropyridazine, sulfisoxazole, sulfaquinolaxine의 各 설과劑를 100ppb의 濃度로 牛乳에 加한 다음 抽出 定量하였을 때 설과劑의 種類에 따라 各各의 溶出 時間은 1.55分~23.31分 이었으며, 回收率은 94.2~6.7% 였다.
- 4) HPLC 定量 分析으로 檢出된 설과劑는 1種 10農家, 2種 3農家, 3種 2農家 등 2種 以上の 설과劑가 5農家에서 檢出되었다.
- 5) 설과劑 種類別로는 總 12種 설과劑중 sulfisomidine 11件, sulfamethazine 5件, sulfadimethoxine 3件, sulfathiazole 2件, sulfadiazine 1件 順으로 5種이 檢出되었다.
- 6) 檢出된 설과劑량은 最大 sulfamethazine 210.3ppb, 最小 sulfamethazine, sulfisomidine이 各各 2.2ppb이었다. 100ppb以上이 1件(4.5% -sulfamethazine 1건), 50~100ppb가 4件(18.1% -sulfamethazine)

zine, sulfisomidine 各各 2件), 25~50 ppb가 6件(27.1% -sulfisomidine 2건, sulfadiazine, sulfadimethoxine, sulfamethazine, sulfathiazole 各各 1件), 10~25 ppb가 3件(13.7% -sulfisomidine 3건), 10 ppb 未滿이 8件(36.4% -sulfisomidine 4件, sulfadimethoxine 2件, sulfamethazine, sulfathiazole 各各 1件)이 檢出되었다.

參 考 文 獻

1. 농림수산부. 1996. 농림수산부 통계자료.
2. Horwitz W. 1981. Analytical method for sulfonamides in foods and feeds. - I review of methodology. *J Assoc Off Anal Chem.* 64(1) : 104~108.
3. Liska BJ. 1960. A direct microscopic method for detecting antibiotic activity in milk. *J Milk Food Technol.* 23 : 117~121.
4. 박종명. 1990. 사료첨가용 항균물질이 가축의 생산성 및 인체에 미치는 영향. *대한수의사회지.* 26(2) : 81~89.
5. 이우주. 1993. 이우주의 약리학강의. 의학문화사 : 553~557.
6. 이장락. 1989. 수의약리학. 서울대 출판부 : 370~371.
7. 김은아 등. 1991. 우유에 내재하는 항생물질 검출 방법의 비교. *한국낙농학회지.* 13(2) : 110~115.
8. 농림수산부. 1993. 농림수산부고시 제 1993-13호.
9. 심영화 등. 1992. 우유중의 잔류설파제 동시다제 분석법에 관한 연구. *대한수의공중보건학회지.* 16(1) : 61~71.
10. Heeschen WH, Suhren G. 1995. IDF integrated detection system for antimicrobials : Introductory statement and practical experiences in Germany. *IDF Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk* : 310~318.
11. 강국희. 1996. 우유항생물질을 해부 한다. 유가공협회, 우유(봄) : 15~19.
12. 이창업. 1993. 수의 독성학. 서울대 출판부 : 390~392.
13. 농림수산부. 1996. 농림수산부고시 제 1996-46호. 축산물시험방법중 개정고시.
14. Bloomfield G. 1989. *Veterinary drug residues.* PJB publication Ltd. UK. P.121~189.
15. Cullor JS. 1993. *Antibiotic residue testing.* University of California.
16. 김기성 등. 1994. 집유검사 및 유대지급 제도 개선 연구(2년차). 한국식품개발연구원.
17. Charm SE. —. An integrated system monitoring milk for FDA "Safe Levels" using charm test methods. *Antibiotic and milk methodology.* Association of food and drug officials : 17~29.
18. Charm SE, Zomer E, Salter R. 1988. Confirmation of widespread sulfonamide contamination in northeast US market milk. *J Food Protection.* 51(12) : 920~924.
19. Korsrud GO, et al. 1992. Evaluation and testing of Charm test II receptor assays for the detection of antimicrobial residues in meat. *Analysis of antibiotic drug residues in food products of animal origin.* Edited by VK. Agarwal Plenum Press, New York : 75~79.
20. Zomer E, Salter R. 1995. Charm II test, updates : Performance testing in USA and performance in incurred studies. *IDF Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk* : 269~271.
21. Carignan G, Carrier K. 1991. Quantitation and confirmation of sulfamethazine residues in swine muscle and liver by LC and GC/MS. *J Assoc Off Anal Chem.* 74(3) : 479~482.
22. Manual AJ, Steller WA. 1981. Gasliquid chromatographic determination of sulfamethazine in swine and cattle tissue. *J Assoc Off Anal Chem.* 64(4) : 794~799.
23. Munns RK, Raybal JE. 1982. Rapid gasli-

- quid chromatographic method for determination of sulfamethazine in swine feed. *J Assoc Off Anal Chem.* 65(5) : 1048~1053.
24. Simpson RM, Suhre FB, Shafer JW. 1985. Quantitative gas chromatographic mass spectrometric assay of five sulfonamide residues in animal tissue. *J Assoc Off Anal Chem.* 68(1) : 23~26.
 25. Takatsuki K, Kikuchi T. 1990. Gas chromatographic mass spectrometric determination of six sulfonamide residues in egg and animal tissues. *J Assoc Off Anal Chem.* 73(6) : 886~892.
 26. Cox BL, Krzeminski LF. 1982. High pressure liquid chromatographic determination of sulfamethazine in pork tissue. *J Assoc Off Anal Chem.* 65(6) : 1311~1315.
 27. Smedley MD, Weber JD. 1990. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. *J Assoc Off Anal Chem.* 73(6) : 875~879.
 28. Weber JD, Smedley MD. 1989. Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk. *J Assoc Off Anal Chem.* 72(3) : 445~446.
 29. Weber JD, Smedley MD. 1993. Liquid chromatographic method for determination of sulfamethazine residues in milk. Collaborative study. *J AOAC International.* 76(4) : 725~729.
 30. Weber JD, Smedley MD. 1992. Rapid HPLC determination of sulfamethazine in milk. FDA. *Bacteriological Analytical Manual.* (7) : 253~258.
 31. 한국동물약품협회. 1994. 동물용의약품 분류집. 한국동물약품협회 출판부.
 32. 한국동물약품협회. 1995. 유방염 연고제 관리 방안에 대한 협의회 자료.
 33. Larocque L, Carignan G, Sved S. 1990. Sulfamethazine residues in Canadian consumer milk. *J Assoc Off Anal Chem.* 73(3) : 365~367.
 34. IDEXX. Laboratories Inc. 1992. Cite Sulfa Trio test kit.
 35. 이홍길. 1995. 식육내 유해잔류물질의 현황과 대책. *한국가축위생학회지.* 19(1) : 71~83.
 36. Sundlof SF, Riviere JE, Craigmill AL. 1992. Food Animal Residue Avoidance Databank (FARAD) ; A comprehensive compendium of dairy cattle drugs . Institute of Food and Agricultural Sciences. Univ of Florida.
 37. 김영수, 황래홍. 1992. Sulfamethazine 및 trimethoprim이 원유의 TTC 검사에 미치는 영향에 관한 연구. *한국가축위생학회지.* 15(2) : 101~108.
 38. 조병훈 등. 1993. 원유중 잔류 설파제의 검출을 위한 2,3,5 -Tri-phenyl Tetrazolum Chloride(TTC) 환원 시험법의 개량. *한국수의공중보건학회지.* 17(1) : 77~86.
 39. Charm SE, Zomer E. 1995. The evolution and direction of rapid detection/identification of antimicrobial drug residues. IDF. *Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk* : 224~233.
 40. Bossuyt R, et al. 1976. Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography. *J chromatography.* 124 : 37~42.
 41. Thomas MH, et al. 1981. Determination of sulfamethazine in swine tissue by quantitative thin-layer chromatography. *J Agr Food Chem.* 29 : 621~624.
 42. Unruh J, et al. 1993. Quantitation of sulfamethazine in pork tissue by thin-layer chromatography. *J AOAC International.* 76(2) : 335~341.
 43. 박병옥 등. 1991. 원유중의 잔류 항생물질 및 설파제 조사. *한국가축위생학회지.* 14(1) : 63~69.
 44. 신연경, 김태중, 윤화중. 1994. 돈육내 sulfonamides의 잔류물질 검출에 관한 연구. 대

- 한수의학회지. 34(4) : 843~850.
45. 황인진 등. 1990. SOS test kit 및 HPLC법에 의한 도축돈의 뇨, 신장 및 근육내 설파메 타진 잔류량 조사. 한국가축위생학회지. 13(1) : 21~26.
 46. Long AR, et al. 1990. multiresidue method for the determination of sulfonamides in Pork tissue. *J Agric Food Chem.* 38 : 423~426.
 47. Smedly MD. 1994. Liquid chromatographic determination of multiple sulfonamide residues in bovine milk. Collaborative study. *J AOAC Internatioal.* 77(5) : 874~879.
 48. Smedley MD. 1994. Multiple sulfonamide residues in raw bovine milk. -Liquid chromatographic method. *J AOAC International.* 77(5) : 1111~1122.
 49. Tishler F, et al. 1968. Improved method for determination of sulfonamides in milk and tissue. *J Agr Food Chem.* 16(1) : 50~53.
 50. 박병욱. 1993. 원유중의 잔류 설파제 조사를 위한 액체크로마토그래피 및 신속진단법의 비교연구. 건국대 논문집.
 51. 박준조, 이규춘, 고흥범. 1994. 고속액체크로마토그래피에 의한 식육중 설파제 잔류량 분석에 관한 연구. 한국공중보건학회지. 18(4) : 317~326.
 52. 박찬구 등. 1990. 돈육에 잔류하는 sulfamethazine 정량법의 비교 연구. 서울대학교 수의대 논문집. 15(2) : 22~45.
 53. 정규생 등. 1993. 액체크로마토그래피를 이용한 동물근육 조직중의 합성항균제 동시 분석. 대한식품위생학회지. 8(1) : 25~35.
 54. 황래홍 등. 1995. HPLC를 이용한 축산식품중 잔류 설폰아미드제의 동시분석법연구. 한국가축위생학회지. 19(1) : 13~28.
 55. 정재하, 한수남, 이문한. 1991. Fluorescamine을 이용한 우유중에 잔류하는 sulfamethazine의 HPLC 형광정량법. 서울대학교 수의대 논문집. 16(1) : 23~33.
 56. 박중명. 1992. 축산물 잔류물질 규제에 대한 국내의 동향. 연구 세미나 목록집 : 150~153.
 57. CAC. 1993. Residues of veterinary drug in food. CAC Rome. Codex alimentarius. 3.
 58. MacNeil JD. 1995. Physical/chemical methods for analysis of antimicrobial drugs and other inhibitors in milk. IDF Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk : 274~287.
 59. 정병곤. 1995. 식품규격 위원회 제 9차 식품중 동물약품잔류 분과위원회 참석 결과 보고. 국립동물검역소.
 60. Maturin LJ. 1995. National drug residue milk monitoring program. IDF Residues of Antimicrobial Drugs and Other Inhibitors in Milk : 319~323.
 61. Sterner KE. 1993. The pasteurized milk ordinance. *The veterinary clinics of North America.* WB Saunders Company.
 62. 손성완. 1995. 우유중 항생물질 잔류 허용기준 및 검사방법. 한국유질유방염연구회. 고품질 안전우유 생산을 위한 학술 심포지움.
 63. 보건복지부. 1996. 보건복지부 고시 제 1996-10.