

碩士學位論文

양식넙치의 oxytetracycline 검출법에  
관한 연구

指導教授 金 在 河



濟州大學校 産業大學院

生命産業工學科

金 秀 訓

2000

# 양식넙치의 oxytetracycline 검출법에 관한 연구

指導教授 金 在 河

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

2000年 6月 日


濟州大學校 産業大學院


生命産業工學科(食品工學)


金 秀 訓

金秀訓의 工學碩士學位 論文을 認准함.

2000年 6月 日

委員長 송 대 진  印

委 員 金 在 河  印

委 員 高 영 환  印

# 目 次

Summary .....	1
I. 서 론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	8
1. 재료 .....	8
1.1 양식넙치 시료와 공시균주 .....	8
1.2 기구 .....	8
1.3 시약 및 표준품 .....	8
1.4 <i>B. cereus</i> 시험균액 조제 .....	9
2. 방법 .....	11
2.1. 생물학적 방법을 이용한 OTC검출법 .....	11
2.1.1 근육 직접 검사법 .....	11
2.1.2 간이시험법 .....	11
2-2. HPLC를 이용한 OTC검출 및 정량법 .....	12
2.2.1 시료 전처 .....	12
2.2.2 HPLC분석 조건 .....	12
2.2.3 OTC 검량선 계산 .....	15
2.2.4 OTC 회수율 및 농도계산 .....	15
2.2.5 HPLC 분석시 OTC의 확인 .....	16
III. 결과 및 고찰 .....	17
1. 근육 직접 검사법에 의한 OTC 검출 .....	17
2. 간이 시험법에 의한 OTC 검출 .....	20
3. HPLC를 이용한 OTC 검출 .....	23
3.1 표준 검량선 .....	23

3.2 OTC의 회수율	27
3.3 수출용 활넛치중 OTC 검출	28
IV. 요약	35
V. 참고문헌	36



# A Study on detection method of oxytetracycline in cultured flatfish

Su-Hun Kim

*Department of Industrial Life Science and Technology*

*Graduate School of Industry*

*Cheju National University*

*Supervised by professor Jae-Ha Kim*

## Summary



Direct muscle sampling method, simplified testing method and HPLC method were carried out to detect oxytetracycline in cultured flatfish. Muscle sampling method has excellence point of confirming antibiotics existence directly on plate without any particular processing of sample, but It is impossible to identify antibiotics and also improper to make quantitative measurement of residual antibiotics.

Although Japanese ministry of health welfare standard simplified test could be used to test degree of residue which is specific in oxytetracycline by using pre-treatment method of sample, sample

pre-treatment is complicated and needs much of manpower and expenditure and results could be differentiated according to such factors as testing strains therefore, testers own judgement could be involved in improper standard concentration levels.

HPLC method a instrumental analysis method need costly instrument and skills in handling, but shows excellence in analysis and quantification of analysed results. since minimum detectable amount is 0.05 ppm in cultured flatfish and residue could clearly be detected around 0.1 ppm, the detectable permitting standard HPLC seem to be most suitable method in judging of necessary custom's clearance.

However, since great time manpower and budget are necessary in pre-treatment of sample and rapid custom's clearance in great amount of inspection is difficult such method as ELISA which could be rapidly tested in great amount of samples might be further studied.

# I. 서론

WTO 체제 출범에 따른 국가간 자유 무역 확대로 국내의 수산물 교역은 해마다 증가하고 있다. 수산물은 다른 공산품과 달리 상당량이 생물(生物) 혹은 가공되어 사람에게 섭취되거나, 사료로 가공되어 이용됨으로서, 유해 물질이 혼입 되거나 각종 병원균으로 오염 될 경우 국민 보건에 커다란 영향을 미칠 수 있다. 이에 따라 각국은 수산물 수·출입시 자국민의 건강과 안전을 위해 검역 기준을 점차 엄격히 적용하고 있고, 검역 제도를 강화하여 일정 기준 이상의 수산물 혹은 농산물만을 통관·유통시킴으로서 자국(自國) 산업 보호 효과를 꾀하고 있다.

현대 수산업은 근해나 원양에서 단순 포획하던 형태에서 벗어나 어류 및 패류의 종묘를 일정시설 내에서 사육하는 양식업의 형태로 점차 발전하고 있는데, 제주도의 경우 양식 어업이 145개소의 넓치 양식장에서 연간 9,949톤이 생산되고 있다( 제주도청 해양수산현황 4월호, 2000).

양식업은 생산 원가 절감을 위하여 격리된 시설 내에서 다량의 어패류를 밀식 사육하는데, 사육조 내에서 어병(魚病)이 발생할 경우 집단 발병이 불가피하고 따라서 막대한 경제적 손실과 생산성 저하가 초래된다. 이에 어병의 집단 발병에 의한 경제적 손실을 예방하기 위하여 페니실린, 테트라사이클린, 퀴놀론, 설파제 등의 항생제와 호르몬제, 소독제, 영양제 등 다수의 동물약품을 직접 혹은 사료첨가제 형태로 사용하고 있다.(하 등, 1997; 박 등, 1990) 이들 동물약품은 투약 후 일정 기간동안 양식 어류의 체내에 잔류하게 되어

이들 약품이 잔류된 어류를 사람이 섭취하였을 경우 인체로 이행되어 약제에 따른 부작용을 일으켜 항생제 내성, 간독성(肝毒性), 기형아 출산 등의 유해한 영향을 끼친다. (박등, 1990) 이러한 이유로 한국을 포함한 미국, EU, 일본등 세계 각국은 동물에 사용되는 약제에 대하여 투약 후 일정 기간의 휴약 기간과 어류 체내 잔류량에 대한 기준을 두어 항생제 및 각종 약제의 사용량을 규제를 하고 있고, 시장에 유통중인 어류 및 동물의 생물(生物)과 가공품으로부터 이들 약제들의 잔류 유무와 잔류량을 지속적으로 검사 분석하여 모니터링하고 있으며, 편리하고 신속 정확한 검출법 개발을 위하여 지속적인 연구를 진행하고 있다.

Oxytetracycline(OTC)은 테트라사이클린계 항생 물질로 그람양성 및 음성균의 성장을 억제하는 정균(靜菌) 작용으로 항균 활성을 나타낸다. 직접 및 사료첨가 등으로 투약이 용이하고, 타 항생제에 비하여 가격이 저렴하여, 많은 양식장에서 각종 어병의 치료 및 예방에 널리 이용되고 있으나 동 계열의 약제가 잔류된 어류와 육류를 인체가 허용 기준이상으로 반복 섭취하였을 때에는 간 지방증(steatosis)등 간 기능이상을 나타낼 수 있다는 보고가 있으며 동물 실험에서 과량 투여에 따른 지방간 유발, SGOT, alkaline phosphatase 역가 상승, 광과민증등을 일으킨다는 보고가 있다 (Nicholas and Mcdonald, 1985 ; 박 등, 1990 ; Stricker and Spoelstra, 1985 ; Zimmerman, 1978 ; Hopf 등 1985) 또한 어류에 잔류된 약물로 인해 인체의 정상 균총 파괴와 각종 항생제 내성 병원균의 출현으로 국민 보건을 크게 위협할 수도 있다. 이에 FAO/WHO 합동 식품 공전위원회(CODEX)에서는 육류중 OTC의 최대 잔류 허용치를 0.1ppm으로 설정하고 있으며 (Codex , 1993),



국내에서도 보건복지부 고시 제1996-10 ('96.3.4)호에 의거하여 OTC 0.1ppm, 테트라사이클린 0.25ppm 수준으로 다른 항생제 보다 허용 기준을 높게 설정하고 있고, 투약 시에는 출하 전 40일의 휴약 기간을 두어 관리하고 있다.(제주지방해양수산청, 1999)

어류나 육류 등으로부터 항균, 항생제를 분석 검출하기 위한 방법으로는 생물학적 검출법, 기기적 분석법, 면역 화학적 분석법이 이용된다. 생물학적인 검출법은 대상 시료를 직접 이용하거나 혹은 시료 추출액을 일정 크기의 종이 디스크에 흡수시키고, 감수성 미생물이 도말된 배지상에서 미생물 생육 저지환의 생성을 통하여 항생물질의 잔류를 확인하는 방법으로 생물학적 검정법(bioassay)(박, 1991; 농림수산부, 1995; 조 등, 1996)이라고도 한다. 이 방법은 다량의 시료를 적은 비용으로 간편하게 검정할 수 있다는 장점이 있어 근래에 까지 이용되고 있으나, 미생물의 생리적 상태, 혹은 시료의 상태에 따라 결과에 따른 재현성이 떨어지고, 잔류된 항생 물질의 동정이 잔류량을 정확히 측정할 수 없는 단점이 있다. 수출입 품목의 통관과 같이 일정한 잔류 허용 기준치가 정해진 항목에 대하여 수치화된 결과가 필요한 경우에는 검출물에 대한 감도와 특이성이 뛰어난 기기적 분석법이 많이 이용된다. 잔류 항생 물질의 검출에 이용되는 기기적 분석법으로는 HPLC(High performance liquid chromatography)법과 GC(Gas chromatography)법이 주로 이용된다. 이들 두 방법에서는 물질이 이동하게되는 고정상(stationary phase)과 용매에 녹아 이동하는 물질(mobile phase) 사이의 분배 계수에 따라 단위 시간당 물질의 이동율이 달라짐을 이용하여 특정 물질의 검출 유무를 판정하고, 검출된 물질을 분광기(spectrometer), 방사선 검출기(radio detector), 형광 검출기(fluorimeter)등으로 정량

화가 용이하다. 기기 분석법에 의한 항생제 검출에서는 고가의 장비와 분석 시약을 필요로 하고, 검체에 따라 시료 전처리 방법이 달리고 안되어야 하는 등의 단점을 갖고 있으나, 특이성과 검출 감도가 매우 높고 결과에 대한 신뢰도가 뛰어나 검역등 객관적인 결과를 요할때 매우 적합한 방법이다. 현재 테트라사이클린계(De Wasch 1998), 페니실린계(Moats WA 1998), 퀴놀론계(Bauer JF, 1990)등 여러 항생제가 기기적 분석법으로 검출되어 식품등의 항생제 잔류 검사에 이용되고 있고, 국내에서도 식육 및 우유 등에서 HPLC를 이용 OTC을 효과적으로 검출하고있다. (농림수산부, 1995)

최근들어 항원 항체 반응을 이용하여 항생 물질의 존재 유무를 확인하고, 잔류량을 측정할 수 있는 ELISA(Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay)법이 이용되기도 하는데, HPLC와 GC법에 비하여 시료 전처리가 비교적 간단하고, 단시간내에 많은 시료를 정량화할 수 있다는 장점 때문에 쇠고기, 닭고기, 기타 가금류에서 테트라사이클린계(De Wasch 1998)와 salinomycin(KennedyDG1995) 등 항생물질을 검출할 수 있는 방법이 확립되어 검역에 이용되고 있다. 이외에도 TLC (Thin layer chromatography)(박, 1991), 방사선 동위원소 수용체 시험법(Charm 1980)등이 항생 물질 검출에 이용되고 있다.

제주도내의 양식넙치 생산량 중 상당 부분이 활어 상태로 일본으로 수출되고 있는데 수출량도 90년도 64톤, 94년 492톤, 98년 2,283톤 으로 꾸준히 증가되는 추세에 있다.(통계청자료, 1999). 활넙치 양식의 경우 어병의 집단 발병을 예방하기 위하여 항생 물질 사용이 불가피한데, 제주도내 활넙치 양식장에서 사용중인 항생제 종류와 사용량, 활넙치중의 항생 물질 잔류량에 대한 정확한 통계자료는

없는 상태이나, 1999년초 일본에 수출된 활넙치에서 잔류 허용량인 0.10 ppm 이상의 OTC가 검출되어 활넙치의 항생물질 검역이 선통관 후검역 방식에서 선검역 후통관 방식으로 강화된 바가 있어(해양수산부, 1998) 수출 활넙치중 OTC 잔류량에 대하여 체계적 관리가 필요하다.

본 연구에서는 향후 활넙치 및 수산물 수·출입 과정에서 문제될 수 있는 OTC의 검출을 위하여 기준량인 0.10ppm을 가장 정확하고, 효율적으로 검출 할 수 있는 방법을 찾고자 OTC의 생물학적 검출법, HPLC 분석법 등을 시행하였으며, 대일 수출전 검사 의뢰된 활넙치에서 OTC의 검출을 모니터링 하였다.



## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1.1 양식 넙치 시료와 공시 균주

OTC 검출을 위한 시료로는 제주도내 양식장에서 사육중인 넙치 중 1999년 5월부터 2000년 12월까지 국립 수산물 검사소 제주 지소로 잔류 검사가 의뢰된 양식 넙치를 사용하였고, 항균성 검사를 위해서 국립보건원에서 분양받은 *Bacillus cereus* var. *mycocoides* ATCC 11778을 공시 균주로 이용하였다.

#### 1.2 기구

OTC검출을 위해 사용한 HPLC기기는 미국 TSP사 model의 분석기기를 사용하였으며 HPLC부속기기중 송출부분의 기기는 P4000 (Pump)를 사용하여 용매를 선택적으로 일정량의 유속으로 흘려보낼 수 있도록 하였고, 검출 부분의 기기는 AS3000 (auto sampler)를 사용하였으며, 데이터 처리부분에 있어서는 UV 3000(Detector)을 사용하였다.

Solvent Bottle내에 있는 bubble을 제거하기 위해 He 가스를 사용했으며 본 실험에 사용하는 컴퓨터의 소프트 프로그램 운영은 미국 TSP사에서 개발한 ChromQuest를 이용하였다.

#### 1.3 시약 및 표준품

본 실험에 사용된 시약중 염산옥시테트라사이클린 표준품, Anhydrous는 Sigma사의 특급시약을 사용했으며 그밖에  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,

Disodium EDTA, Citric acid monohydrate, Oxalic acid dihydrate 등도 특급을 사용하였다. Methanol, Acetonitril은 HPLC용을 사용하였으며 증류수는 18M $\Omega$  이상을 사용 하였다

필터는 PTFE filter 0.45 $\mu$ m, 13mm, Cellulose acetate filter 0.45 $\mu$ m, 25mm, Whatman GF/B filter를 사용 했으며 SEP-PACK C-18 Cartridge는 미국 Water사 제품을 사용 하였다

#### 1.4. *B. cereus* 시험균액 조제

계대 보존하고 있던 *B. cereus* 균주를 nutrient agar 평판 배지에서 30 $^{\circ}$ C, 18시간 배양한 후 멸균 생리 식염수 5 ml로 균을 모아 배양병 평판에 도말한 후 30 $^{\circ}$ C에서 7일간 배양하였다. 배양 후 아포염색을 통하여 80% 이상 아포가 형성되면 멸균된 glass bead와 생리 식염수 20ml을 배양병 안에 넣고, 흔들어 균을 모은 후 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열하고, 이를 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층을 제거하고, 침전물을 멸균 생리수 20ml로 부유 시켜 원심 분리한다. 이 과정을 3회 반복한 후 남은 침전물에 생리식염수 20ml을 첨가 부유시킨후 65 $^{\circ}$ C에서 30분간 가열한다. 다시 3,000rpm 20분간 원심 분리한후 상등액을 버린후 잔류물을 멸균 생리식염수에 다시 부유시켜 이를 아포부유액으로 한다. 아포부유액은 Antibiotic medium No.8배지에서 표준 평판 회석법으로  $10^6 - 10^7$ 개/ml이 되도록 농도를 조절하고, 이를 4 $^{\circ}$ C 냉장고에 보관하여 사용하였다.

sample bacteria

↓

mix with 5ml saline solution

↓

inoculate to Roux Bottle (Nutrient agar)

↓

collect bacteria after putting 50ml of sterile distilled water

↓

remove upper liquid after 10 min centrifuge following 65°C, 30 heating

↓

repeat washing after mixing with sterile distilled water

↓

mix lower liquid with sterile distilled water

↓

re-heating 65°C, for 30 min

↓

dilute with sterile distilled water

↓

refrigerate or freezing storage

↓

plating



**Fig. 1. Preparation of culture media of *B.cereus***

## 2. 방법

### 2.1 미생물학적 방법을 이용한 OTC 검출법

#### 2.1.1 근육 직접 검사법

활납치 시료를 1 X 1cm 로 절단한 후 *Bacillus cereus* var. *mycocoides* ATCC 11778가 도말된 평판 배지위에 올려놓고 30℃에서 18시간 배양하여 생육 저지환의 크기를 조사하였다.

#### 2.1.2 간이 시험법

납치에서 가능한 한 지방층이 제거된 근육 조직 10g을 떼어내어 마쇄하여 균질화 시킨 후 Ethylene Acetate가 함유된 citric acid buffer 100ml을 첨가하여 잘 흔들어준다. n-Hexane 100ml을 가하여 5분간진탕 배양한후 3,500rpm으로 10분간 원심분리하여, n-hexane 이외의 수층만을 취하여 여과 추출한후 활성화된 PS-2 카트리지에 통과 시키고, 메탄올로 유출된 액을 40℃ 회전증발농축기에서 증발 시키고 증발 잔류물을 1.36% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>용액으로 용해시킨다. 용액을 다시 펄프 디스크에 적셔 10분이상 건조 시키고 표준용액 0.2 ppm을 적신 펄프디스크와 함께 검사용 평판에 올려놓아 30±1℃에서 17±1℃ 시간동안 펄프디스크를 배양시킨다. 배양후 저지환(沮止環)이 0.2 ppm(14mm)이상인 것을 양성으로 판정한다.

## 2.2 HPLC를 이용한 OTC 검출 및 정량법

### 2.2.1 시료 전처리

넙치의 근육 부위에서 5g 시료를 채취한 후, EDTA McIlvane buffer 20ml을 주입하고, 2분간 homogenizer로 분쇄 균질화시킨다. Homogenizer probe에 묻은 시료는 EDTA McIlvane buffer 2ml로 세척한 후, 2분 동안 진탕하고, 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수한다. 침전물에 EDTA McIlvane buffer 20ml을 재첨가하여 2분간 진탕후 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하는 과정을 2회 반복하고, 회수된 상등액 60ml을 2분간 진탕후 3000 rpm에서 10분간 원심분리한다. 원심분리후 Whatman GF/B filter(90mm) 두장으로 필터한 후, C-18 cartridge에 천천히 한방울씩 통과시켜 시료액을 버린다(1drop/sec). C-18 cartridge에 3차 증류수 10ml로 세척 후 수기(受器)에 MeOH 20ml로 용출(1drop/sec)시킨 후 40℃에서 진공 농축하여 MeOH를 완전히 증발시킨 후 이동상 용액 1ml로 용해시킨 후 Acrodisk 13CR PTFE 0.45 $\mu$ m filter로 여과하여 시험용액으로 분석에 이용하였다.

### 2.2.2 HPLC분석 조건

C18-column (3.9mm X 300mm, 10 $\mu$ m, Waters)에 0.01M oxalic acid : acetonitril : MeOH ( 7 : 2 : 1 )용액을 이동상으로 하여, 0.4ml/min의 유속으로 시료 60 $\mu$ l를 주입하여, 350nm 자외선 파장에서 OTC를 검출하였다.



sample 5g

↓

adding 0.1M-EDTA McIlvane buffer of 20ml

↓

Homogenize

↓

Vortex mix for 2min

↓

centifuge (3,000rpm for 10min)

↓

taking upper liquid into another centrifuge tube

↓

into residue adding EDTA Mc buffer of 20ml

↓

Vortex mix for 2min

↓

centrifuge (3,000rpm for 10min)

↓

adding upper liquid into former centrifuge tube

↓

into residue adding EDTA Mc buffer of 20ml

↓

Vortex mix for 2min



↓  
centrifuge (3,000rpm for 10min)  
↓  
after mixing all upper liquid centrifuge for 30min at 3000rpm  
↓  
filtering with Whatman GF/B  
↓  
activate C18 cartridge  
↓  
drip into former filtrate into activated C18 cartridge (1drop/sec)  
↓  
wash with 3rd distilled water 10ml (1drop/sec)  
↓  
elute with 20ml of MeOH (1drop/sec)  
↓  
evaporate at 40°C  
↓  
dissolve into 1ml of mobile phase  
↓  
filterate with Acrodisk 13CR PTFE 0.45µm filter  
↓  
HPLC(60µl injection)

**Fig. 2. Pretreatment procedure for the determination of OTC  
in flatfish by HPLC**

### 2.2.3 OTC 검량선 계산

순도 99.999%의 OTC 표준품 10mg을 메탄올 10ml에 용해시킨 후 3차중류수로 10배 희석하여 100 ppm 표준 용액을 만든 다음 100 ppm 표준용액을 이동상 용액으로 100배, 200배, 1000배 희석하여 1ppm, 0.5ppm, 0.1ppm이 되게 하고, 각기 60 $\mu$ l를 기기에 주입하여 표준 검량선을 구하였다.

### 2.2.4 OTC 회수율 및 농도 계산

OTC 표준용액 100ppm을 자연산 넙치 5g에 60 $\mu$ l 주입하고 앞에 제시된 방법에 의해 시료를 전처리 한후 기기에 시료를 주입하여 나오는 측정값으로부터 회수율을 계산하였고, 활넙치 시료에서의 농도는 다음의 식을 이용 계산하였다.

$$\text{회수율} = \frac{\text{시료에서 회수된 OTC의 양}}{\text{시료에 첨가된 OTC의 양}} \times 100$$

$$\text{시료중의 OTC 농도} = \frac{\text{시료의 peak area}}{\text{표준용액의 peak area}} \times \frac{\text{표준용액 농도}}{\text{시료무게}} \times \frac{1}{\text{회수율}}$$

### 2.2.5 HPLC 분석시 OTC의 확인

시료의 HPLC chromatogram상의 peak가 OTC인지 여부를 확인하기 위하여, 1.0ppm OTC 표준 용액과 활넙치 시료에서 HPLC chromatogram 상의 검출 peak에서 spectrum pattern의 유사도 및 . 325nm파장~375nm파장에서 OTC표준용액 파장과 비교하여 같은 모양의 파장이 형성될 시 OTC검출 peak로 판단 하였다.

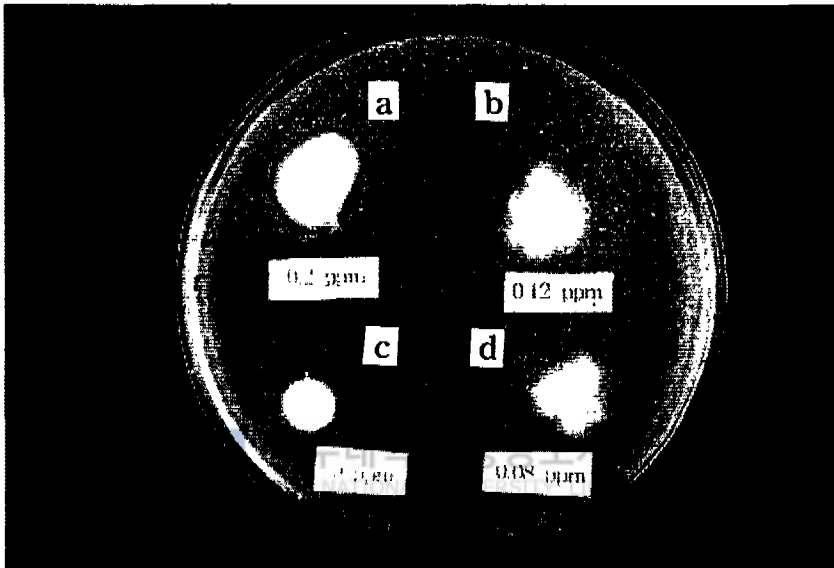


### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. 근육 직접 검사법에 의한 OTC 검출

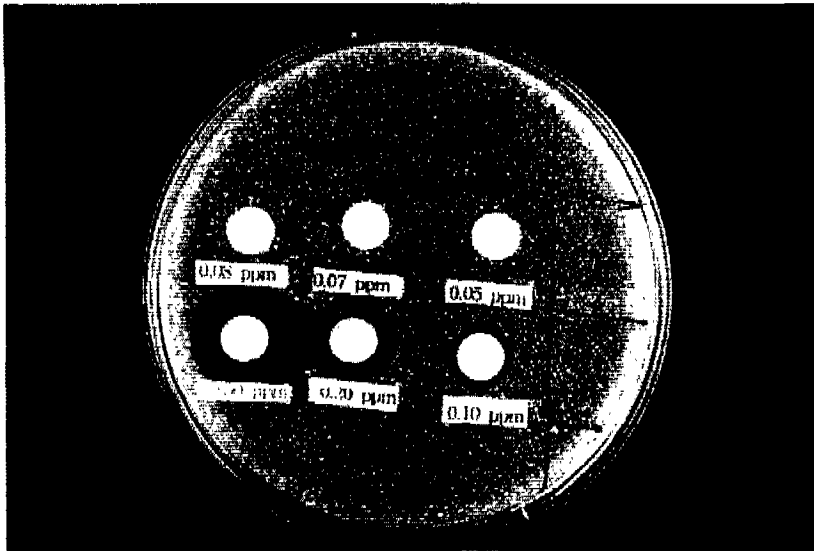
HPLC 분석 결과농도가 밝혀진 활넙치 시료로부터 근육을 채취하여 직접 평판에 올려 놓고 미생물의 생육 저지(沮止)를 확인한 결과, Fig3 에 나타난 바와 같이 0.2ppm OTC을 직접 근육 주사한 시료에서는 생육저지환이 확인 되었으나, 0.08ppm, 0.12ppm시료에서는 생육 저지환(沮止環)이 생성되지 않았으나 Fig4에서는 넙치의 근육을 갈아 펄프디스크에 적신후 실험한 결과 OTC 0.1ppm 부터 검출이 됐으나 배지조성된 기간이 경과함에 따라 저지환(沮止環)의 크기가 다름을 알수있다.

근육 직접법의 경우 항생물질이 잔류된 시료에서 간편하게 다량의 시료에서 항생제의 잔류 유무를 확인 할 수 있으나, 검출하고자 하는 항생물질이 아닌 다른 물질에 의해서도 생육 저지환이 나타나는 의양성(疑陽性) 반응이 나타나거나, 시료에 항생제에 감수성이 없는 균이 오염될 경우 생육 저지대에 오염된 균이 이상 증식하여 결과를 확인하지 못하는 의음성(疑陰性) 반응이 나타날 수 있다. 또한 Fig.4에서 보는바와 같이 검출 기준량 이상이 잔류되어 있더라도 검출 한계량이 낮아 수·출입 검사와 같이 정확한 결과를 요하는 시험에는 적절하지 못한 방법으로 사료된다.

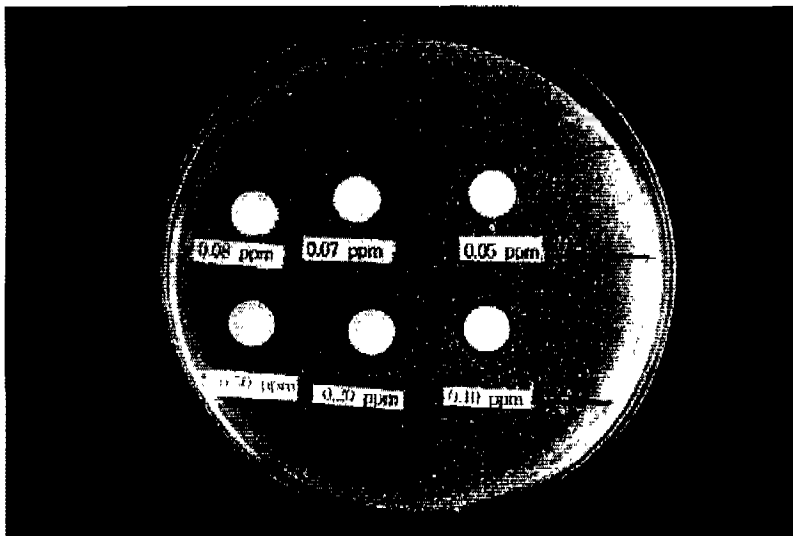


**Fig.3. Direct bioassay of antibiotics using flatfish muscle  
(a:0.2ppm b:0.12ppm c:0.1ppm d:0.08ppm)**

A)



B)



**Fig.4. Bioassay of OTC at different concentration using disk paper method**

**A: Passed 2 days after media preparation**

**B: Passed 3 days after media preparation**

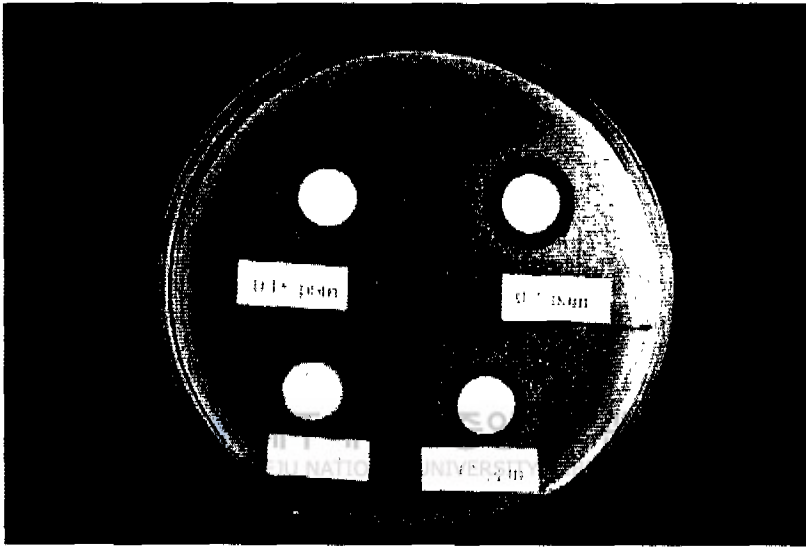
## 2. 간이 시험법에 의한 OTC 검출

활넙치 시료 추출액과 OTC 표준용액을 흡수 시킨 펄프 디스크를 평판에 올려놓고, 생육 저지환의 생성 유무를 확인한 결과 OTC 표준용액 0.10ppm이상에서 생육저지환을 확인할 수 있었다. 또한 검출 기준량이상의 OTC가 잔류된 활넙치 시료 추출액에서도 뚜렷한 생육 저지환을 확인 할 수 있었다. 간이시험법에서 생육저지환의 크기가 14mm 이상일 경우 OTC 양성으로 판정을 하게 되는데 Fig에서 검출 농도가 0.12, 0.18, 2.0 ppm인 시료에서 생육 저지환의 크기가 모두 14mm이상으로 양성 판정 되었다. 그러나 table에서 보는바와 같이 배지를 제조한 경과 일 수에 따라 동일한 농도의 시료에 따른 실험 결과가 달라질 수 있고, 검출 기준량인 0.10ppm 에서 생육 저지환의 크기가 기준치인 14mm 보다 적게 나타나는 경우가 많아, 검사 결과에 따른 신뢰도가 낮고, 결과 판정에 있어서도 실험자의 주관에 개입될 소지가 크다.

간이 시험법은 HPLC나 다른 기기적 분석법에 비하여 조작이 간편하고, 고가의 장비를 필요로 하지 않아 항생물질 잔류 분석에서 선호되고 있는 방법이다. 그러나, 실험에 이용된 시료 추출법이 OTC에 특이적으로 고안된 추출법으로 다른 종류의 항생제에 의한 의양성 반응을 어느 정도는 배제시킬수 있으나, 검출 하고자하는 항생제와 용해 계수가 유사한 항생제나 동일 그룹의 항생제로부터 특정 항생제만을 특이적으로 검출하고자 할 경우에 의양성 반응을 완전히 배제시킬수 없는 한계를 가지고 있다. 또한 잔류 허용 기준량이 극미량인 경우 검출이 불가능한 경우가 많고, 여러 인자가 검출 한계에 영향을 준다. 특히, 균주에 따라 시험 약제에 대한 최저 검출량이 크게 달라지는데, *B. cereus*의 경우 OTC의 최저 검출 한계



량이 0.1ppm 이지만 *B. subtilis*와 *M. luteus*의 경우는 0.5ppm이상의 OTC만을 검출 할 수 있다. 동일한 균주를 사용할 경우 이외에도 검출 한계에 영향을 주는 요인으로 사료에 첨가되는 강장제, 각종 비타민제, 호르몬제등이 있으며, 동일한 균주를 이용하더라도 균주의 상태에 따라 결과에 결정적인 영향을 끼칠 수 있다. 시험 균주중 아포를 이용하는 균주는 영향이 적으나, 균영양액을 이용할 경우에는 상당한 영향을 받을 수 있으므로 균주에 대한 세심한 관리가 병행되어야 한다.



**Fig.5. Detection of OTC extracted from live flatfish**

### 3. HPLC를 이용한 OTC 검출.

#### 3.1 표준 검량선

1ppm, 0.5ppm, 0.1ppm OTC 표준용액 50 $\mu$ l를 HPLC에 주입하여 Fig6과 같은 표준 검량선을 얻었으며, 농도 대비 peak area와 peak height와의 상관계수는 0.9975 ~ 0.9989 범위로 고도의 상관성을 보였다.

OTC (UV3000-350nm)  
Average RF: 3.8984e-006      RF StDev: 5.76552e-007      RF %RSD: 14.7895  
Scaling: None      LSQ Weighting: None      Force Through Zero: On  
Replicate Mode: Replace  
Fit Type: Linear  
 $y = 4.22466e-006x + 0$   
Goodness of fit ( $r^2$ ), 0.997638

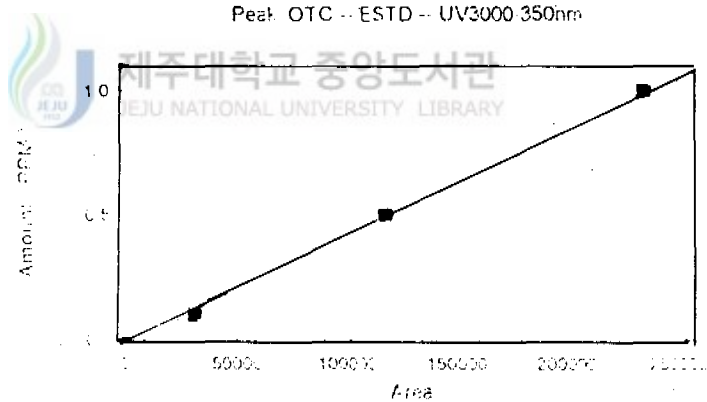
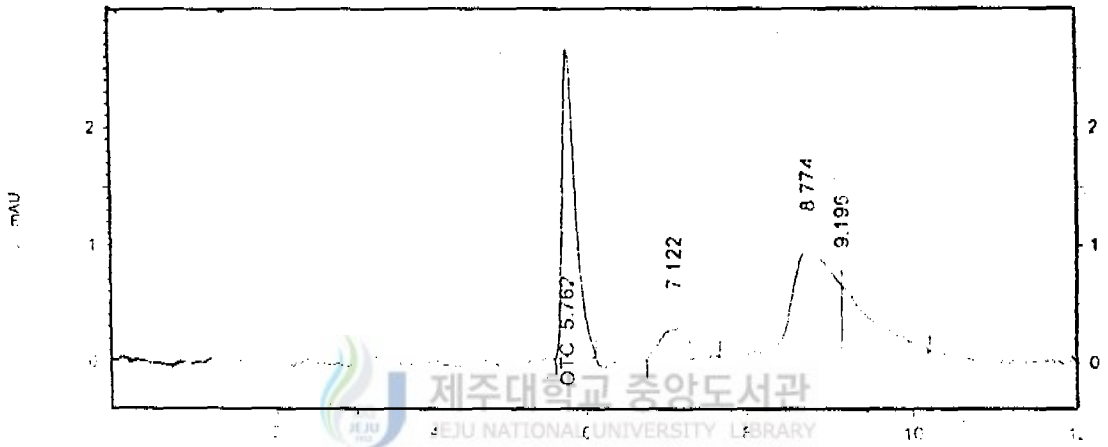
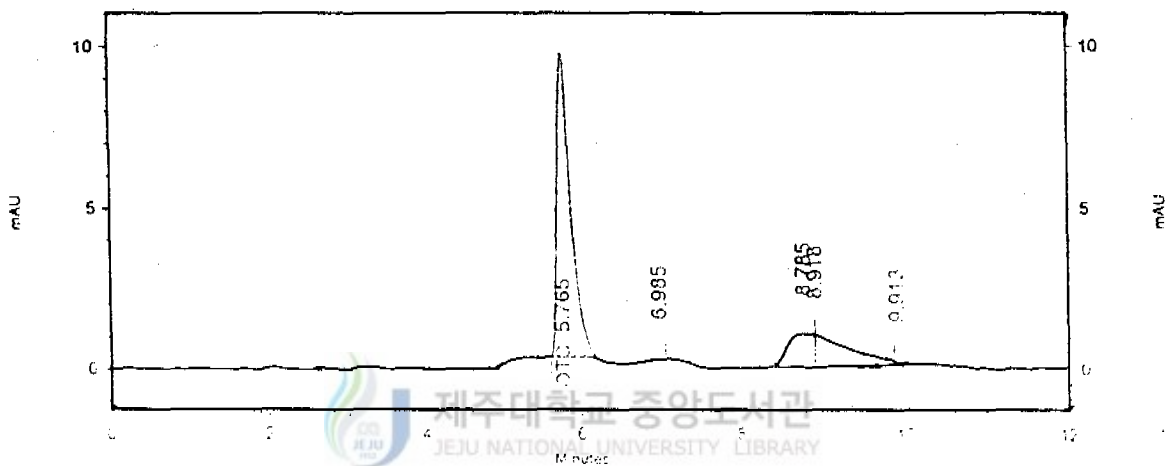


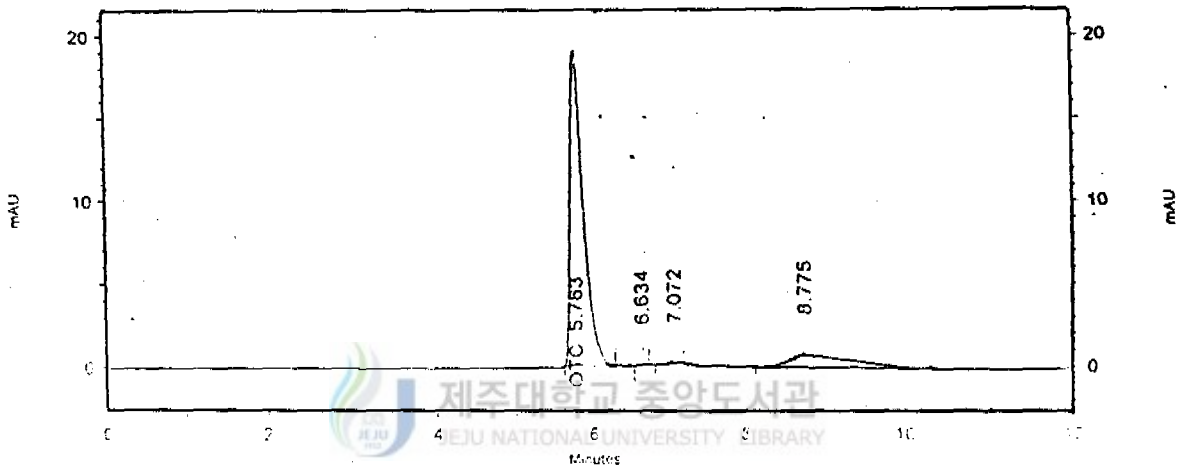
Fig.6. Standard curve for assay of OTC(Oxytetracycline)



**Fig.7. Chromatogram of 0.1ppm standard solution**



**Fig.8. Chromatogram of 0.5ppm standard solution**



**Fig.9. Chromatogram of 1.0ppm standard solution**

### 3.2 OTC의 회수율

OTC의 회수율을 구하기 위하여 자연산 넙치 근육 5g에 OTC 표준 용액을 주입하여 0.01ppm, 0.05ppm, 0.1ppm, 0.5ppm, 1.0ppm 농도가 되게 한 후 시료를 추출한 다음 회수율을 조사하였다. Table.1.에 나타난 바와 같이 평균 85% 정도의 양호한 회수율을 나타내었다.

**Table.1. Recovery rate of OTC spiked in wild flatfish muscle**

Amount of added OTC(ppm)	0.05	0.1	0.5	1.0
Re / Co	0.83	0.86	0.85	0.87
Recovery (%)	82.56	85.63	85.52	86.84

Re : Recovered peak area      Co : Control peak area

### 3.3 수출용 활넛치중 OTC 검출

1999년 5월부터 1999년 12월 까지 검사 의뢰된 활넛치에서 OTC 잔류량을 조사하였다. Table2 에서 볼 수 있는 바와 같이 검사 의뢰된 총 87개의 시료중에서 검출 기준량 0.10ppm 이상의 OTC가 검출되어 부적합 판정을 받은 시료는 22건으로 전체의 25%에 해당한다. 월별로는 6월과 7월에 각각 42%, 47%로 매우 높은 부적합율을 보였다. 이는 6, 7월 고온 다습한 기후로 미생물 증식이 증가하는 시기에 맞추어 OTC 투약이 증가한데 기인한 것이라 여겨지며, 8~12월 까지 평균 기온이 감소하면서 OTC에 따른 부적합율은 감소하였다.

OTC 파장을 조사한 결과 Fig10에서 보는바와 같이 350nm~360nm에서 최대 흡광도를 가짐을 알 수 있다. 그러나 저농도에서는 Fig11과 같이 OTC파장이 완만하지 못하고 굴곡이 심함을 보여주고 있다 Fig12는 5.99분대~6.00분대에서 0.24ppm의 고농도OTC Peak 및 파장을 나타내지만 저농도에서는 Fig13의 0.16ppm도 OTC 파장이 Fig12와 조금 상이하나 325nm~375nm파장에서는 정상적인 OTC파장을 이루고 있어 OTC는 350nm~360nm에서 최대의 흡광성을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

넛치에 있어 OTC 휴약기간은 40일로 정하고 있어 수출이나 국내에 출하시, 출하전 40일 동안 OTC 투약을 금지하고 있다. 그러나 통상적으로 휴약 기간 동안에도 질병 발생 억제를 위해 항생제 투여가 간혹 이루어지고 있다. 특히 고온 다습한 여름철의 경우 항생제 사용의 증가로 수출 및 국내유통 넛치에 과량의 항생제가 잔류하게되는 원인이 되고 있다.

적은 공간내에 다량의 어류를 밀식으로 증식시키는 양식업의 특성



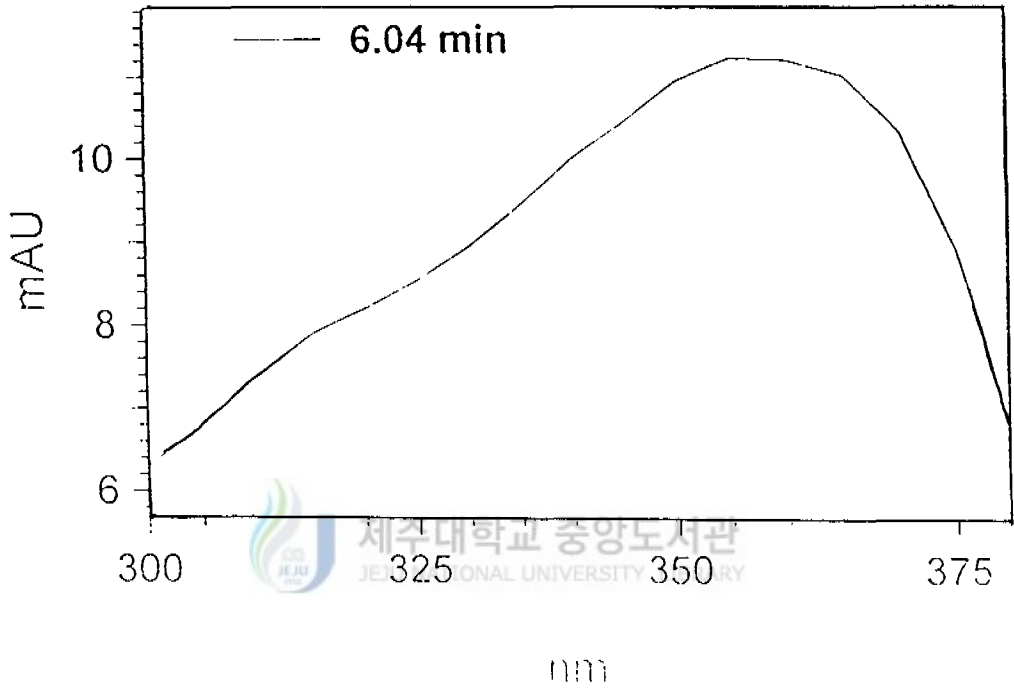
상, 어병 발생 방지를 위한 항생물질 사용을 완전히 금지할 수는 없겠으나, 양식 넙치에 대한 소비자들의 신뢰를 증대시키고, 일본등 해외로의 수출을 촉진하기 위하여 휴약 기간 준수등의 지도를 강화하고, 독성과 잔류성이 적은 항생제로 OTC를 대체하거나, 항생제 사용을 될 수 있는 한 줄이면서 어병 발생율을 감소시킬 수 있는 효과적인 양식법의 개발도 병행되어야 하리라 본다.



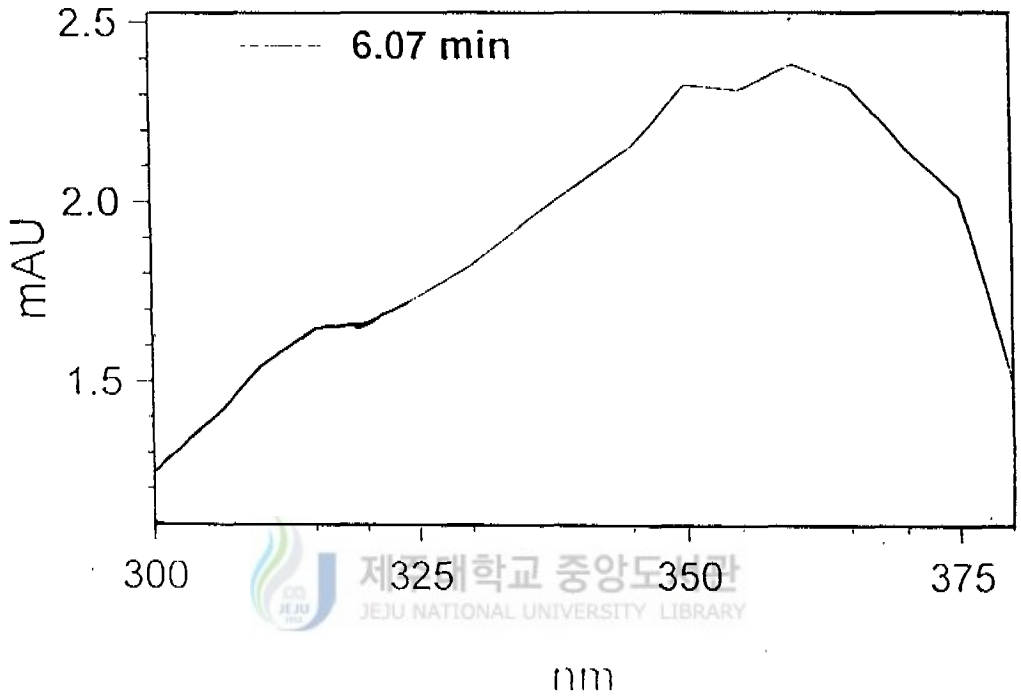
**Table.2. Detection rates of OTC by HPLC test**

Month	Number of Samples	Passed	Samples Recjected	Percentage of Rejected Samples(%)
May	14	11	3	21
June	12	7	5	42
July	17	9	8	47
August	4	3	1	25
September	3	3	0	0
October	4	4	0	0
November	29	24	5	17
December	7	7	0	0



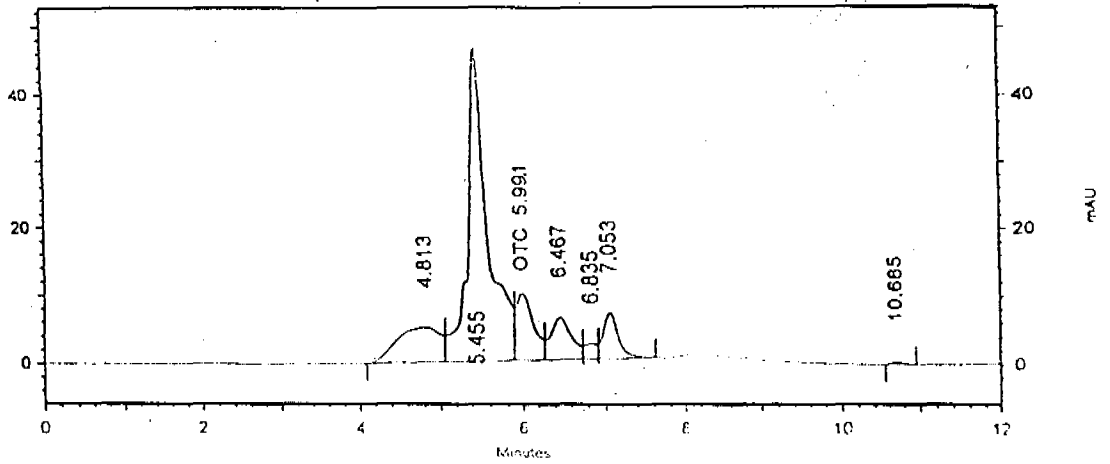


**Fig.10. Spectrum at time 6.04min of standard 1.0ppm of OTC**

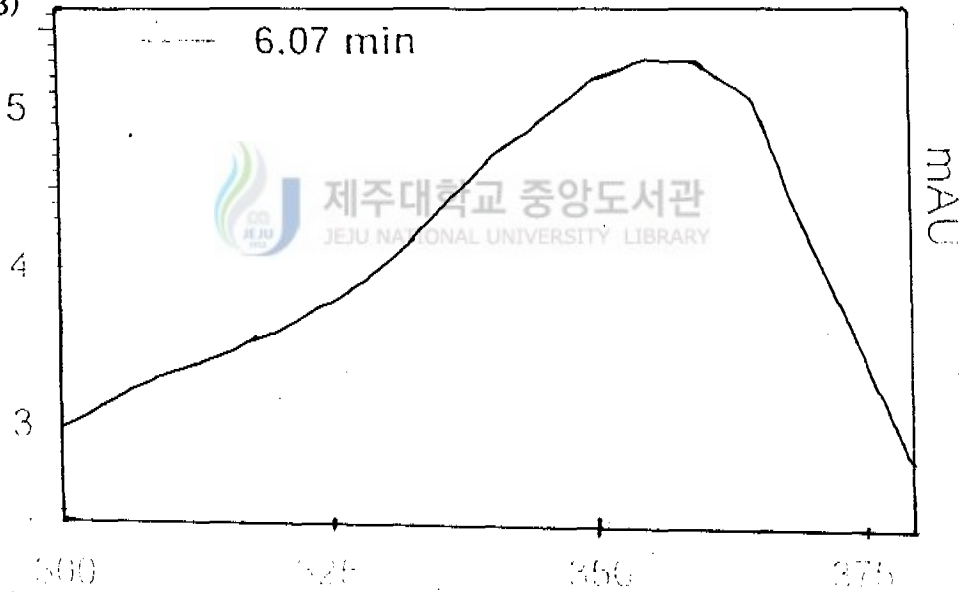


**Fig.11. Spectrum at time 6.07min of standard 0.1ppm of OTC**

A)



B)

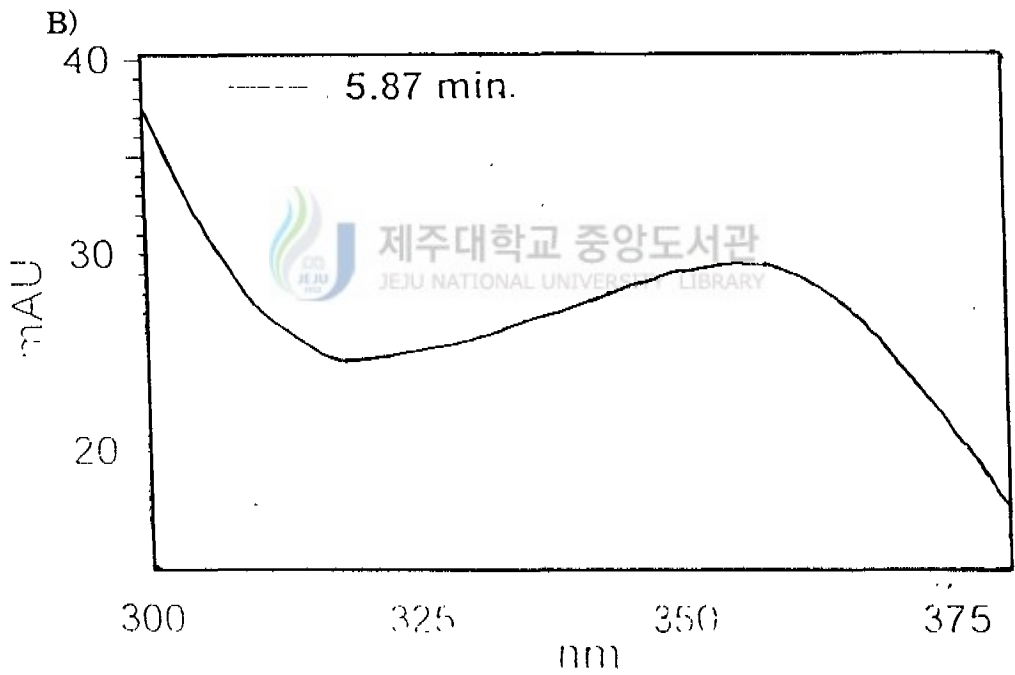
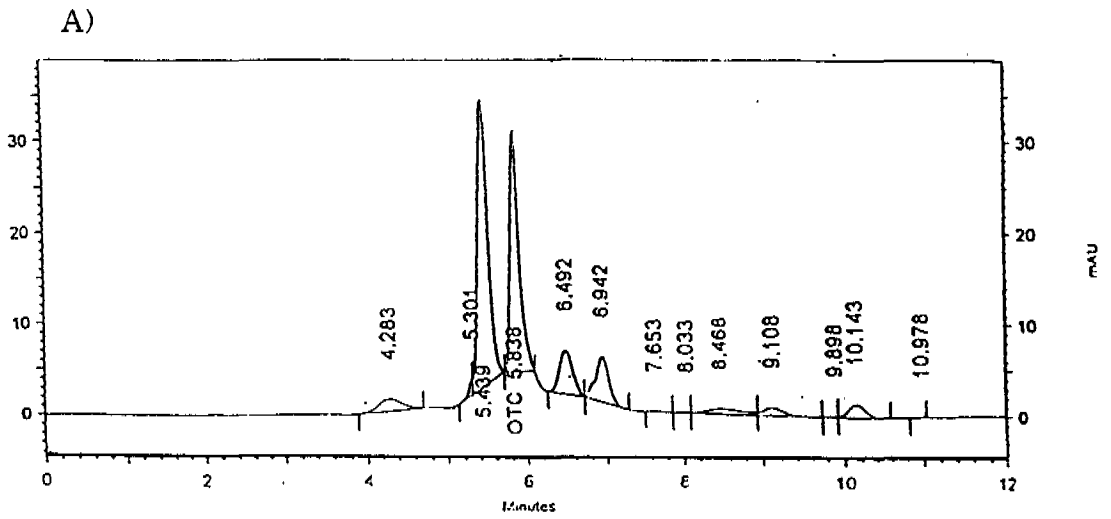


(111)

**Fig.12. Detection of sample 0.24ppm of OTC**

**A: OTC peak at 5.99min**

**B: Spectrum of OTC at 6.07min**



**Fig.13. Detection of sample 0.16ppm of OTC**

**A: OTC peak at 5.83min**

**B: Spectrum of OTC at 5.87min**

## IV. 요약

양식중인 활넙치내에서 OTC를 검출하기 위하여 근육직접법, 간이 검사법, HPLC법을 수행하였다.

근육직접법은 시료의 별다른 처리 없이 평판에서 직접 항생물질 잔류 여부를 확인 할 수 있다는 장점이 있으나, 특정 항생물질만을 특이적으로 확인 할 수 없고, 잔류 항생제를 정량화 하는데는 적합하지 못하였다.

일본 후생성 표준 간이 시험법은 옥시테트라사이클린에 특이적인 시료 전처리법을 사용함으로써 비교적 옥시테트라사이클린에 특이적인 잔류도를 측정 할 수있으나, 시료 전처리가 번거롭고 인력 및 비용이 많이 들며, 시험 균주와 같은 요인에 의해 결과가 달라 질 수 있어 부적합 기준 농도 수준에서는 시험자의 자의적 판단이 개입될 가능성을 안고 있다. 기기적 분석법인 HPLC법은 고가의 장비를 필요로 하고, 기기를 다루는데 숙련되어야 한다는 단점이 있으나, 분석 특이성이 뛰어나고 분석된 결과를 수치화 하는데 매우 유리하다. 양식 넙치에서의 OTC 검출에 있어서도 한계 검출량이 0.05ppm 이고, 검출 허용 기준치 0.1ppm 근처에서 잔류량을 명확히 구분 할 수 있으므로 하여, 활넙치에서 OTC를 검출하고, 수출입에 필요한 통관 적합성 여부를 판단하는데 아주 적합한 방법이라고 확인되었다. 그러나 시료 전처리에 시간과 인력 및 예산이 많이 소요됨으로 인하여 대량 검역시에는 신속한 통관 검사에 불리한 면이 있어, ELISA등과 같이 대량의 시료를 신속히 검사 할 수 있는 검출법에 대하여서도 추후 지속적인 연구가 필요하다.

## V. 참고 문헌

방종득, 방극순, 김성길, 1995. 양식생물 질병진단연구. 1994년도 동해수산연구소 사업보고서, pp 167-172.

Bauer, JF Determination of temafloxacin, sarafloxacin, and difloxacin in bulk drug and dosage forms by high-performance liquid chromatography. Pharm Res. 1990 Nov;7(11):1177-80.

보건복지부. 1996. 식육중 잔류물질 허용기준. 보건복지부 고시 제 1996-10호.

장원석, 허승욱. 1998. 輸入農産物의 危害性과 對應方案. Kor. J. Agri., 10(2). pp 40-49.



Charm, SE. 1980. Microbial receptor as say for rapid detection and identification of seven families of antibacterial drugs in milk. J Assoc Off Anal Chem 71 : 304-316

제주지방해양수산청, 1999. 수산약품 사용안내. pp. 5-7

전세규. 1988. 양식어류의 세균성질병의 진단과 대책. Bull. Korea Soc. Fish Pathology, 1(1), pp 5-30.

조병훈, 진남섭, 손성완 등. 1996. EEC-4 plate test의 식육중 항균물질 검출감도와 항균 물질 계열별 검출능의 비교조사. 한국식품위생.



안전성 학회지 11(4) : 307-314

조태행, 이광식, 진남섭 등. 1993. 테트라싸이클린계 항생물질의 분석기법 개발 및 잔류물질에 관한 조사. 한국수의공중보건학회지 17(3) : 321-328

Codex AC. 1993. Residues of veterinary drugs in foods section 1. Maximum residue limites. Codex Alimentarius 3 : 8-13.

De Wasch, K Detection of residues of tetracycline antibiotics in pork and chicken meat: correlation between results of screening and confirmatory tests. Analyst. 1998 Dec;123(12):2737-41.

Grollman, A. 1985. Pharmacology and Therapeutics A textbook for students and practitioners of medicine : 184-185.

해양수산부(수산정책국). 1999. 대일 수출용 활넙치 위생관리 대책 (안).

해양수산부. 1998. 수산용약제연구.

한국식품가공협회. 1994. 식품공전. 문영사 : 807-833

하대식, 김종수, 김곤섭. 1997. MSPD와 HPLC를 이용한 어류의 잔류설파제와 테트라싸이클린계 항생물질의 동시분석. J. Fd. Hyg.

Safety, 12(2), pp117-124.

Hopf, G., Bocker R, Elster CJ. 1985. Comparative effects of tetracycline and doxycycline on liver function of young adult and old mice. Arch Int pharmacodyn 278 : 157.

Huber, WG. 1988. Tetracycline. In : Veterinary Pharmacology and Therapeutics. 6 ed, Booth NH, McDonald LE, ED, Iowa state University Press : 813-821.

황진욱, 이승우, 류정곤. 1997. 넙치 養殖業의 經營實態와 競爭力 提高方案 研究. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Institute, 53. pp 171-191.

강환구, 손성완, 조병훈 등. 1996. 시료고체상 분산 전처리법을 이용한 식육중 테트라사이클린 동시정량분석. 대한수의학회지 16(3) : 541-550

Kennedy, DG. Development of an ELISA for salinomycin and depletion kinetics of salinomycin residues in poultry. Food Addit Contam. 1995 Jan-Feb;12(1):93-9.

고경일. 1996. 우리나라 식물검역제도의 현황과 발전방향. 농산물 수출입과 식물검역 서울대학교 농업생명과학대학 부속농업개발연구소 논문집. pp 7-19.

이장락. 1987. 수의학리학. 서울대학교 출판부 : 394-397.

이장락. 1990. 풀이 동물약품해설. 서울대학교출판부.

이혜숙, 조병훈, 손성완, 강항구, 박정명. 1998. HPLC를 이용한 牛乳  
중 Aflatoxin M1 定量分析法. RDA. J. Veterinary Sci., 10(2), pp  
55-59.

Moats, WA Identification of beta-lactam antibiotics in tissue  
samples containing unknown microbial inhibitors. J AOAC Int.  
1998 Nov-Dec;81(6):1135-40.

Nicholas, HB, McDonald LE. 1985. Veterinary Pharmacology and  
Therapeutic. 5 ed. Iowa State University Press : 740-1088.

농림수산부. 1995. 동물용의약품의 안전 사용 기준. 농림수산부 고시  
제 1995-85호.

오수연, 장원철. 1998. 고성능 역상 액체 크로마토그래피를 이용한  
넙치에서의 Josamycin의 약물동태에 관한 연구. J. Toxicol. Pub.  
Health, 14(4), pp 563-567.

박재명, 최해연, 이은정, 조우영, 조부제, 정운선. 1997. 식육중 테트  
라사이클린계 항생물질 잔류조사. Korean J. Vet. serv., 20(2), pp  
225-233.

박종명, 송성환, 조태행, 조준형, 남궁선, 박근식, 이문한 1990. 국내 산돈육 및 항생물질 잔류조사. 한국수의공중보건학회지, 14(1), pp 61-68

박종명, 신진호, 이광직 등. 1990. 동물약품수급정보 전산화 연구. 농촌진흥청 각축위생연구소 시험연구보고서 : 36~39.

박종명. 1991. 축산식품중 잔류물질 검사법. 도서출판 상록 : 66-67.

심두생, 최상덕. 1995. 양식생물 질병진단연구. 1994년도 남해수산연구소 사업보고서, pp 165-178.

송성옥, 조명행, 신광순 등. 1994. HPLC를 이용한 식육류의 잔류 테트라사이클린계 항생물질의 동시분석법. 한국수의공중보건학회지 18(4) : 343-352

손성완, 조병훈, 진남섭 등. 1996. 식육중 잔류 항균물질의 검출을 위한 *Bacillus megaterium* 디스크 검사 키트 개발. 한국 식품위생. 안전성 학회진 11(4) : 315-321

손성완. 1999. 동물성 식품내 퀴놀론계 항균물질 검출에 관한 연구. 서울대학교 대학원 수의학 박사학위논문.

Stricker, BH, Spoelstra P. 1985. Tetracyclines. In : Drug-induced hepatic injury. Elsevier. Amsterdam : 157.

서정희. 1998. 식품 위생과 소비자 보호. 식품안전을 위한 유해미생물. pp 73-82.

우건석. 1996. 식물검역제도의 중요성. 농산물 수출입과 식물검역 서울대학교 농업생명과학대학 부속농업개발연구소 논문집. pp 1-6.

Zimmerman, HS. 1979. Drug-induced chronic hepatic disease. Med Clin North Am 60 : 567.



## 감사의 글

본 논문이 완성되기까지 항상 정성어린 지도를 아끼지 않으신 김재하 지도교수님께 깊은 감사를 드립니다. 아울러 미흡한 논문에 세심한 관심을 가지시고 많은 조언을 하여주신 송대진, 강영주, 김수현, 하진환, 고영환, 임상빈 교수님께 감사의 말씀을 올립니다. 그리고 논문이 무사히 나오기까지 물심양면으로 도와주신 국립수산물 검사소 제주지소장 강병상소장님과 직원여러분께 감사의 말씀을 드립니다.

논문을 쓰면서 많은 조언을 해준 전경용, 오현정 선생님과 처음부터 끝까지 지켜봐 주신 식품공학과 선·후배님께도 감사의 말씀을 드립니다.

늘 한결같은 마음과 지극한 정성으로 보살펴주신 어머니와 아내 그리고 딸 민지에게 고마움을 전하면서 이 영광을 바칩니다.