

벌꿀中の 殘留抗生物質 및  
**Propionic Acid** 分析에 關한 調查研究

田 相 秀

慶尚南道保健環境研究所

**A Study on Analysis of Residual Antibiotics and  
Propionic Acid in Honey**

Sang-Soo Chun

*Kyungnam Provincial Health Environment Institute*

**Abstract**

A sensitive and simple analytical system for the simultaneous determination of residual oxytetracycline, tetracycline, and doxycycline in honey was described, and that the analytical method for determination of residual propionic acid in honey was established.

Experimental subjects were purchased four kinds of honey, native kind honey, acaccia honey, mixed floral honey, chestnut honey in Kyung Sang Nam Do.

Several microbiological methods are available to determine tetracycline antibiotics(TCs) in foods but their precision appears to be variable and the specificity is questionable.

These methods are considered to be not suitable for analysis of tetracycline antibiotics in honey because honey itself has bacteriostatic action.

For determination of tetracycline antibiotics in honey, therefore the High Performance Liquid Chromatography(HPLC) method was applied, and the propionic acid were determined by Gas Chromatography(G.C).

Ethylacetate, as an extract solvent, was found to be suitable for separation of TCs in honey, but methanol and acetone were not.

The recovery rate of Oxytetracycline(OTC), Tetracycline(TC), Doxycycline(DC) from honey spiked at a level of 10 µg/g were 97%, 89%, and 91%, respectively.

The calibration curve in TCs was linear expression from 2 µg/ml to 10 µg/ml.

As the results of analysis, the residual tetracycline antibiotics were not detected in the 100 samples of honey.

The recovery rate of propionic acid from honey spiked at level of 10 µg/g was 98.3%, and the calibration curves were linear expression from 2 µg/ml to 10 µg/ml.

As the results of analysis, the residual propionic acid was not detected in the 100 samples of honey.

Retention time(min) of OTC, DC, and TC were 3.35, 4.61, and 5.30 minutes at the conditions of table 2, respectively, and retention time(min) of propionic acid was 3.50 minutes at the conditions of table 3.

The residual TCs and propionic acid were not detected in the 100 samples of honey, but there is a possibility that antibiotics or propionic acid will be to remain in honey if they are used during product period in order to prevent putrefaction of honey-bee.

## I. 序 論

天然産物인 벌꿀은 單一食品으로서 自然界에서 얻을 수 있는 營養食品이며 各種 葡萄糖, 果糖, 미네랄, 비타민 等 營養成分이 골고루 含有되어 있다. 옛날부터 藥用 또는 嗜好食品으로 利用되어 珍貴品으로 여겨져 오던 것이 最近에는 常用食品으로서 그 需要가 增加趨勢에 있다.<sup>1)~5)</sup>

天然꿀의 全國 生産家口數는 '80년에는 38,128 戶에서 每年 增加하여 '88년에는 49,030 戶로 1.3 倍 增加하였으며, “꿀벌” 飼育 群數는 '81년에 314,694 群數에 不過하였으나 '88년에는 584,443 群數로 1.9 倍 增加하였다.<sup>1)2)</sup> 이와 같이 벌꿀의 生産 및 需要가 增加함으로써 國內外的으로 벌꿀이 國民健

康에 미치는 影響에 대하여 相當한 關心을 갖게 되었다.

또한 벌꿀 生産過程에서 豫見되는 各種 微生物의 汚染을 防止할 目的으로 使用되는 抗生物質 및 其他 投與物質이 人體에 미치는 影響 等に 關한 研究의 必要性도 強調되어 왔으나 아직까지 別다른 進展을 보지 못하고 있는 實情이다. 特히 꿀벌의 幼蟲期에는 孢子를 形成하는 Bacteria의 一種인 Bacillus arvae white 로 因하여 꿀벌의 幼蟲을 腐敗케 하는 疾病 即 “부저병”이 發生하기 쉬우며 이를 防止할 目的으로 抗生物質인 Tetracycline 系(Oxytetracycline, Tetracycline, Doxycycline)를 設糖물에 添加하여 使用하는 境遇가 많다.<sup>11)~13)</sup> 이때 抗生物質의 使用에 따른 殘留 抗生物質이 벌꿀

Table 1. Number of households and beehives

Year & Area	Number of households										Total	Number of beehives										Total
	1-9	10-49	50-99	100-199	200-299	300-499	500-999	1,000 or more	1-9	10-49		50-99	100-199	200-299	300-499	500-999	1,000 or more					
'81								38,128									314,694					
'82								51,875									395,307					
'83								54,504									443,853					
'84								53,179									451,334					
'85								51,479									467,062					
'86								52,667									520,962					
'87								48,961									534,391					
'88	34,183	12,251	2,041	493	45	14	2	1	49,030	132,990	241,568	129,327	59,069	10,362	4,637	1,490	5,000	584,443				
Seoul	5	12	4	-	1	-	-	-	22	25	255	280	-	200	-	-	-	760				
Pusan	5	20	-	2	-	-	-	1	28	39	487	-	202	-	-	-	5,000	5,728				
Taegu	44	38	6	2	1	-	-	-	141	740	826	320	220	250	-	-	-	2,356				
Inchon	7	-	1	1	-	-	-	-	9	41	-	70	113	-	-	-	-	224				
Kwangju	158	53	10	-	1	-	-	-	222	614	986	505	-	200	-	-	-	2,305				
Taejon	83	66	10	3	-	1	-	-	163	344	1,202	578	410	-	300	-	-	2,334				
Kyonggi	1,585	976	162	38	5	1	-	-	2,767	6,139	21,096	10,527	4,494	1,040	300	-	-	43,596				
Kangwon	3,103	1,210	242	63	6	3	-	-	4,627	11,626	22,406	16,428	7,624	1,450	1,071	-	-	60,605				
Chungbuk	2,819	969	161	51	5	1	-	-	4,006	10,778	21,038	10,814	6,180	1,085	322	-	-	50,217				
Chungnam	2,491	728	97	20	2	2	-	-	3,340	10,226	15,359	5,568	2,653	450	700	-	-	34,956				
Chonbuk	4,639	1,401	304	81	4	1	1	-	6,431	15,937	26,245	17,812	9,868	800	300	890	-	71,352				
Chonnam	6,289	1,398	153	47	6	-	-	-	7,993	22,370	24,152	9,860	5,727	1,639	-	-	-	63,748				
Kyongbuk	6,604	2,727	356	64	4	1	-	-	9,756	31,184	54,279	22,399	7,221	901	320	-	-	116,304				
kyongnam	6,275	2,363	439	99	10	1	-	-	9,187	22,716	47,147	28,044	11,654	2,347	300	-	-	112,208				
Jeju	76	240	96	22	-	3	1	-	438	211	6,090	6,122	2,703	1,024	600	-	-	16,750				

중에 함유할 가능성이 있다. 普通食品中の抗生物質分析은 糖이므로 꿀 그 自體가 微生物發育抑制作用을 하기 때문에 微生物學的方法으로는 그 分析이 不可能하다. 本實驗에서는 HPLC 方法으로 TCs系 分析可能性을 調査研究하였다.<sup>7-12)</sup> 또한 곰팡이의 一種인 *Ascosphaera apis* 는 꿀벌에게 特有的한 “석고병”이라는 疾患의 原因이 되며 이 “석고병”은 우리나라에서 1984年 慶尙北道 浦項 地域에서 發生하여 現在 全國 養蜂場에 傳播되고 있는 實情에 있으며 主로 豫防藥으로는 Propionic acid 를 使用하고 있다. 本研究에서는 또한 벌꿀中에 殘留 可能的한 Propionic acid 및 그 鹽類에 대하여 Gas Chromatography(G.C.)를 利用한 分析方法으로 檢討하였다.

以上 研者는 最近 우리나라 農村에서 꿀벌에 널리 流行되는 “부저병” 및 “석고병” 防止 目的으로 主로 使用하고 있는 Tetracycline antibiotics 및 Propionic acid 와 그 鹽類의 새로운 分析方法을 提示하고 그 實驗結果를 報告함으로써 이 分野에 基礎資料를 提供하고자 本研究를 施行하였다.

## II. 材料 및 方法

### A. 材料

#### 1. 試料準備

實驗에 使用한 벌꿀은 慶尙南道內 꿀벌 飼育農家 9187家口 中 100家口를 對象으로 하였으며 種類는 토종꿀, 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀 4種으로 各各 25件씩 總 100件으

로 하였다.

### 2. 試藥

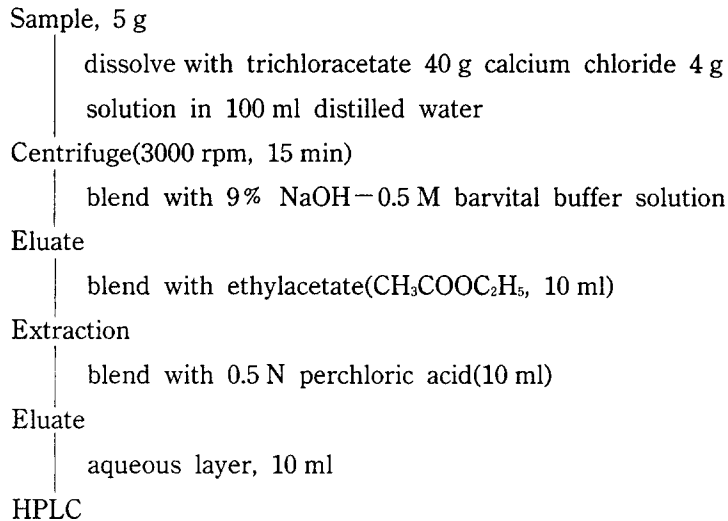
標準物質 및 其他 物質은 다음과 같다.

- Tetracycline, Oxytetracycline, Doxycycline : 國立保健院 및 鍾根堂
- Propionic acid : Aldrich Chemical, Inc., U.S.A
- 強酸性 ion 交換樹脂 : 100~200 mesh, Dowex 50×8, Aldrich Chemical company, Inc., U.S.A
- Gas Chromatograph 充填劑 : Chromosorb 101(80~100 mesh) Gasukuro Kogyo, Inc., Japan AT-1200 : Alltech Associates, Inc
- Reagents
  - Trichloracetate 40 g + Calcium chloride 4 g in 100 ml H<sub>2</sub>O(EP Grade : Wako Chemical Co.)
  - 9% NaOH-0.5 M barbital buffer solution(EP Grade : Wako Chemical Co.)
  - Ethylacetate(HPLC Grade : Wako Chemical Co.)
  - 0.5 N Perchloric acid(EP Grade : Wako Chemical Co.)
  - 10% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(EP Grade : Wako Chemical Co.)
  - NaCl(EP Grade : Wako Chemical Co.)

### B. 實驗方法

#### 1. 抗生物質의 定量

벌꿀 中の 殘留 抗生物質 分析은 H.



Flowchart 1. Systematic analytical method for residual TCs in honey

Oka 와 南原利夫氏 等の 方法에 依하여 High Performance Liquid Chromatograph (Waters Model 6000 A Pump, Injector U 6 K, Absorbance Detector Model 440)를 使用하였다.<sup>9)~14),22)</sup>

a. 試料의 製造

試料의 製造는 H. Oka, K. Uno 및 南原

利夫氏 等に 依하여 벌꿀 中에 殘留하는 抗生物質을 抽出하였으며 抽出方法은 Flowchart 1 과 같다.<sup>6)~14)</sup>

b. 測定方法

抗生物質의 分析은 HPLC 로 定量하였으며 定量條件은 Table 2 와 같다.

Table 2. Determination conditions in analysis of TCs

Description	Condition
Column	$\mu$ -Bondapack C <sup>18</sup> ( 25 cm × 4.6mm I.D )
Mobile phase	0.01 M-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> CN ( 70:30 Adjusted to PH 2.4 )
Detector	U.V 254 nm
Flow rate	2ml/min

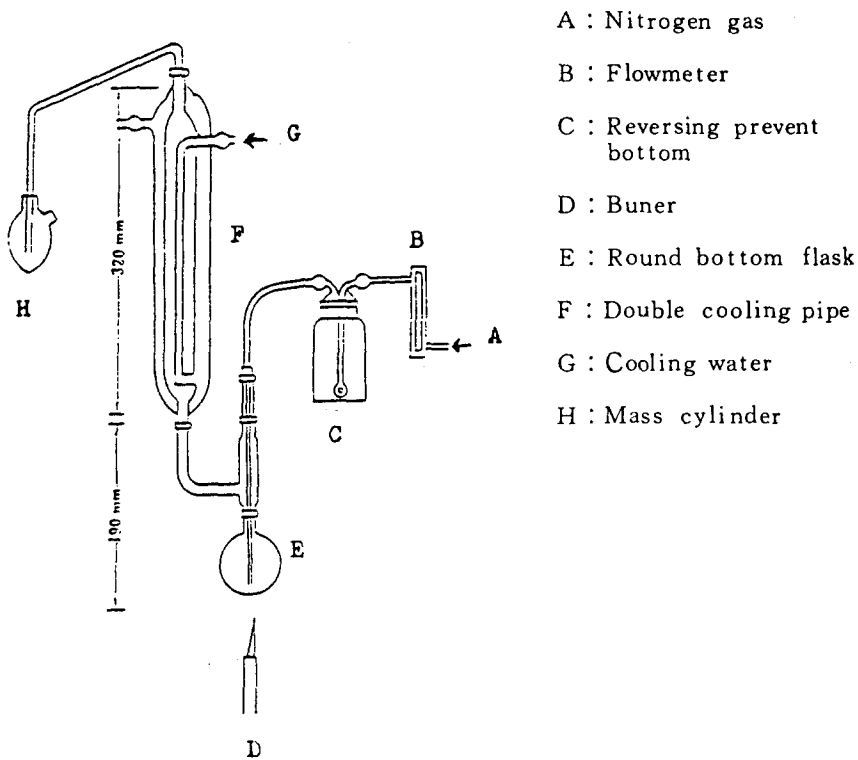


Fig. 1 Distillation equipment

## 2. Propionic acid의 定量

벌꿀 中 殘留하는 Propionic acid의 分析은 食品添加物分析法 및 A.O.A.C法에 依하여 Gas Chromatograph(Shimadzu G.C.~9 A, Recorder C-R 3 A)를 使用하였다.

### a. 試料의 製造

試料의 製造는 Fig 1의 蒸留裝置를 利用하여 檢體 30 g을 500 ml distilling flask에 넣고 水 50 ml, NaCl 80 g, 10% Phosphotungstic acid solution 및 Silicon樹脂 한 방울을 加한 다음 水蒸氣蒸留를 하여 250 ml를 받는다.

이때 수기는 1% NaOH 20 ml를 加하여 冷却器 끝에 잠기도록 한다.

Propionic acid는 Flowchart 2.와 같은 方法으로 精製하여 最終液을 10 ml로 하여 Gas Chromatograph(G.C.)의 試料로 하였다.  
16),19),20),32)

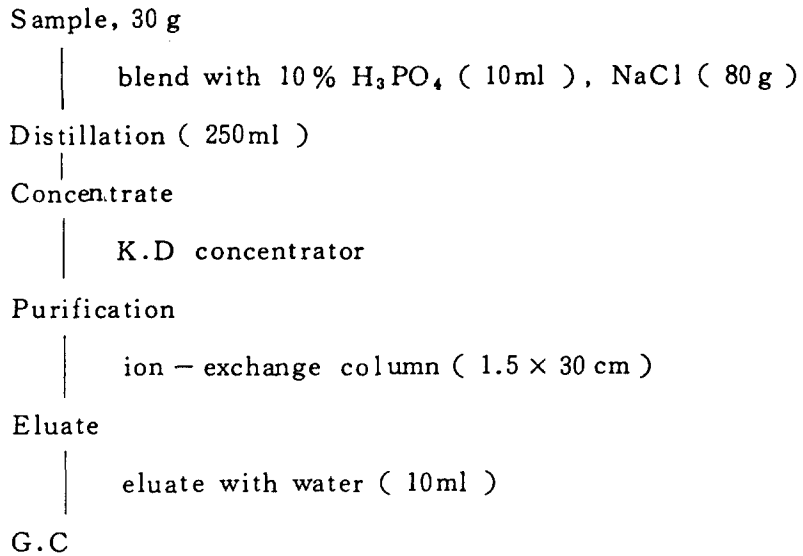
### b. 定量方法

Propionic acid의 分析은 G.C로 定量하였으며 定量條件은 Table 3과 같다.

## III. 結果 및 考察

### A. 抗生物質의 用途와 構造

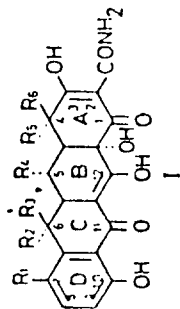
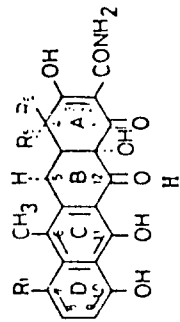
醫藥品으로 取扱되는 抗生物質(antibiotics)을 食品에 添加하여 貯藏에 利用하려는



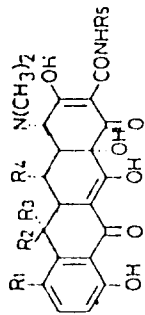
Flowchart 2. Analytical procedure of propionic acid in honey

Table 3 Determination conditions in honey of propionic acid

Description	Condition
Column packings	AT - 1200.8-10%, phosphoric acid 1%, chromosorb 101.80/100 mesh
Column size	Glass 3-4 mm I.D x 2 m
Sample injection	2 $\mu$ l direct injection
Carrier gas	Nitrogen
Flow rate	30-60 ml/min ( 50 ml/min )
Detector	F I D
Combustion gas flows	Hydrogen 0.5 kg/cm <sup>2</sup> , Air 0.5 kg/cm <sup>2</sup>
Column temperature	120°C
Injection temperature	180°C



Compound	Structure	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Tetracycline (TC)	I	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Oxytetracycline (OTC)	I	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Chlortetracycline (CTC)	I	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Doxycycline (DC)	I	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Epitetracycline (ETC)	I	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H
Anhydrotetracycline (ATC)	H	H	—	—	—	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
4-Epianhdrotricycline (EATC)	H	H	—	—	—	H



Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Tetracycline (TC)	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Oxytetracycline (OTC)	H	OH	CH <sub>3</sub>	OH	H
Chlortetracycline (CTC)	Cl	OH	CH <sub>3</sub>	H	H
Doxycycline (DC)	H	H	CH <sub>3</sub>	OH	H
Minocycline (MINO)	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H	H
Methacycline (MTC)	H	= CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>	OH	H
Demeclocycline (DMCTC)	Cl	OH	H	H	H
Rolitetraacycline (PRMTC)	H	OH	CH <sub>3</sub>	H	*

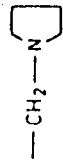


Fig. 2 Structures of tetracyclines



연구가 많이 進行되고 있으며, 또한 항생물질을 日本, 美國, 캐나다 等 國家에서는 腐敗하기 쉬운 家禽類(Poultry), 漁貝類, 쇠고기 等の 貯藏期間을 延長하는데 商業적으로 利用되고 있으며 抗生劑는 主로 Tetracycline 系를 使用하고 있다.<sup>12),13),15),17),18),27)</sup>

Ayros, Mcviker, Walker 等 많은 사람들이 Tetracycline 系 抗生物質을 各種 食品에 1~10 ppm 使用한 結果 細菌 等に 依한 腐敗를 抑制하여 效果의으로 貯藏期間을 延長할 수 있다고 報告 하였으며<sup>27),28),29)</sup> 우리나라의 食品의 規格 및 基準에는 “食品은 抗生物質이 含有하여서는 아니된다”고 되어 있다. 다만, 食肉 中 쇠고기, 돼지고기, 닭고기에 한하여 殘留 許容基準을 定하고 있으나 余他 食品에도 規格 및 基準이 適用될 것으로 展望된다.<sup>25),26)</sup>

Tetracycline antibiotics(TCs)의 構造는 Fig. 2 와 같다.<sup>11)</sup>

## B. High Performance Liquid Chromatography(HPLC)에 依한 抗生物質 分析

HPLC 에 依한 Tetracycline 系 抗生物質 分析은 Table 2 와 같은 條件으로 하였다.

### 1. HPLC Chromatogram

Tetracycline antibiotics(TCs)인 Oxytetracycline(OTC), Tetracycline(TC), Doxycycline(DC) 標準品을 各 10 mg/l 하여 分析한 結果 Fig. 3 와 같으며 各各의 Retention time 은 OTC 3.35, DC 4.61, TC 5.30 分이었다.

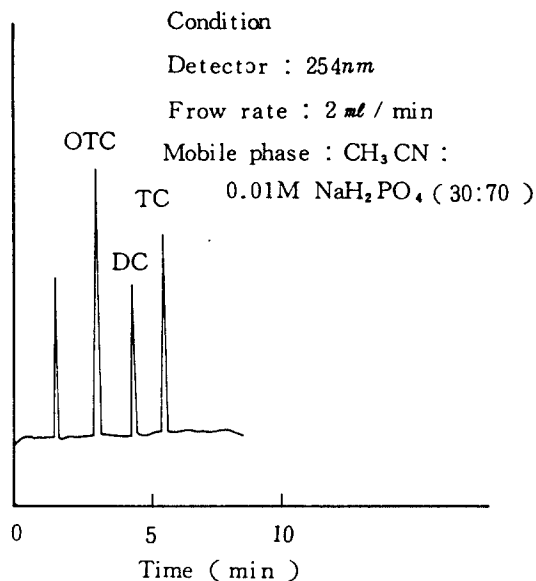


Fig. 3 Separation of tetracyclines by HPLC(column :  $\mu$ -Bondapak C<sup>18</sup>, 25 cm $\times$ 4.6 mm ID)

### 2. HPLC Calibration Curve 作成

Tetracycline antibiotics(OTC, TC, DC)의 濃度別 標準液(2.0~10 mg/l)을 20  $\mu$ l 씩 5 회 Auto injection 하여 各各의 Peak area 및 Peak height 를 Kubelka-Munk 式에 依하여 Linear-expression(1 次式)으로 Fig. 4 와 Fig. 5 와 같이 나타내었다.

### 3. 抗生物質의 回收率

벌꿀 中の TCs 系 抗生物質의 抽出 精製는 Flowchart 1 과 같이 하였으며 抽出 溶媒는 Ethylacetate, Methanol, Acetone 을 使用하였으나 Methanol 과 acetone 은 分離가 일어나지 않아 Ethylacetate 를 抽出 溶媒로 使用하였으며(Tabel 4 참조) Ethylacetate

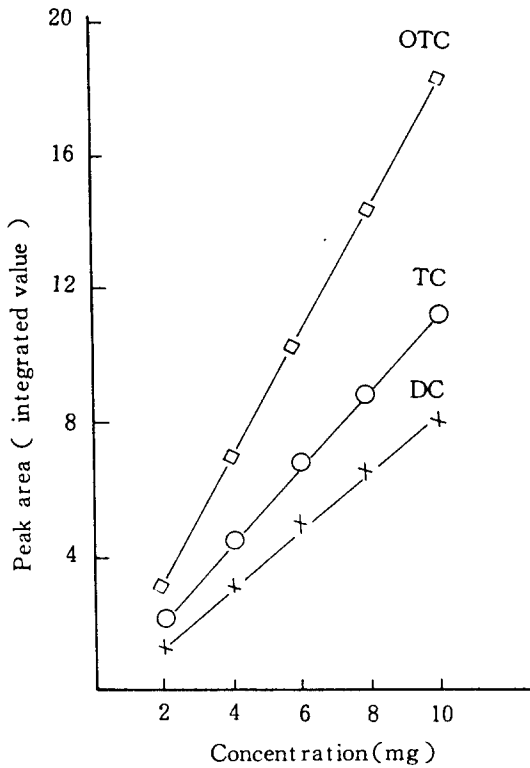


Fig. 4 Calibration curves of tetracyclines for OTC (□), TC(O) and DC(X)

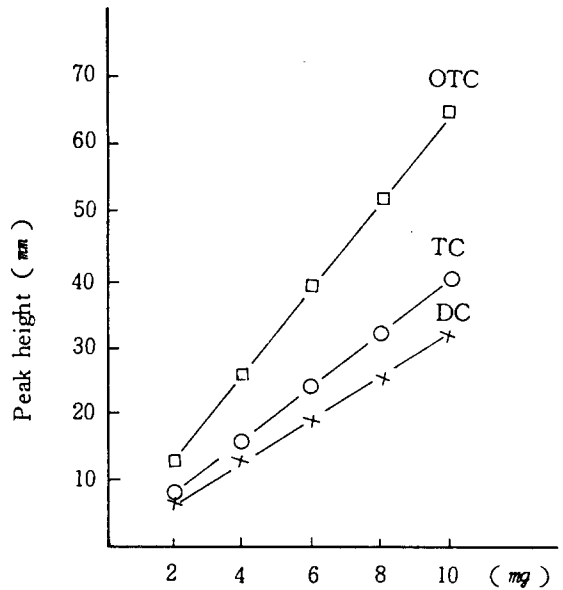


Fig. 5 Calibration curves for TC(O), OTC(□), and DC(X) using HPLC

Table 4 Recovery rate of TCs using 10 ml ethylacetate, methanol, and acetone, respectively

Solvent \ TCs	unit ;%		
	OTC	TC	DC
Ethylacetate	97	89	91
Methanol	-	-	-
Acetone	-	-	-

Table 5 Recovery rate of TCs using 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml and 50 ml ethylacetate, respectively  
unit : %

Volume ( ml ) \ TCs	unit ; %		
	OTC	TC	DC
10	97	89	91
20	92	84	86
30	75	67	68
40	60	53	55
50	58	50	50

使用量(10~50 ml)에 따른 回收率을 본 結果는 Tabel 5 와 같으며 表에서 보는 바와 같이 溶媒 10 ml 에서 回收率이 가장 좋았고 TCs 系 中 OTC 의 回收率의 傾向은 Fig. 6 와 같다.

4. 벌꿀 中의 抗生物質 分析

꿀벌에 發生하는 부저병의 疾病防止用으로 TCs 系를 主로 使用하고 있으며 그 結果 꿀속에 抗生物質의 殘留可能性이 있으므로 OKa, Ikai 等은 벌꿀속의 殘留抗生物質에 關한 抽出, 精製, 分析方法을 研究 報告하였다.<sup>6~13)</sup> 抗生物質의 分析에는 微生物學의 方法으로 이루어져 왔으나 糖이 含有된 食品은 糖自體가 Bacteriostatic action(細菌發育 抑制役割)을 하므로 微生物學의 方法으

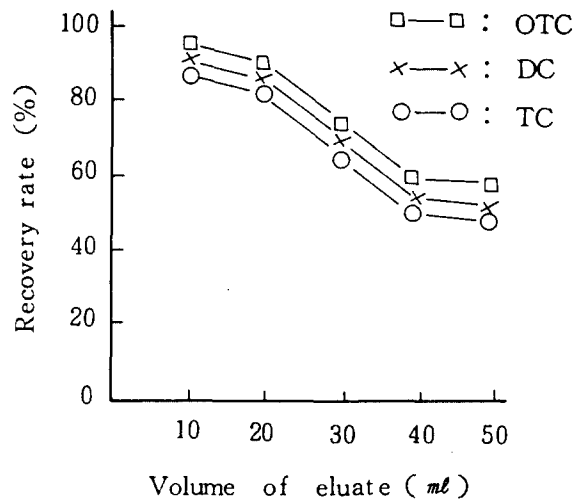


Fig. 6 Recovery rate of TCs using 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml and 50 ml ethylacetate, respectively

로는 不可能하며 食品 中の 糖(Sugar)은 滲透壓差에 依하여 微生物이 利用할 수 있는 水分을 減少시키므로 微生物의 成長을 抑制시킨다. 그리고 糖의 種類에 따라서 滲透速度도 同一하지 않으며 二糖類인 Fructose, Glucose, Invert Sugar 等 分子量이 적을 수록 滲透壓이 크며 一般的으로 微生物은 糖濃度가 50% 以上이 되면 發育이 抑制된다. 따라서 벌꿀의 糖組成을 보면 대체로 Fructose 40%, Glucose 32%, Sucrose 4%로 總糖이 76%이므로 微生物의 發育은 어려운 狀態이다.<sup>12),13),23),24),33),34)</sup>

본 實驗에서는 토종꿀 外 3種 100件을 Table 2와 Flowchart 1에 따라 抗生物質을 分析하였으며 Fig. 7에서 보는 바와 같이 10 mg/l 標準物質과 꿀속에 OTC, TC, DC

各 10 mg/kg 되게 標準物質을 投入한 試料 및 벌꿀을 同一한 方法으로 抽出, 精製, 分析한 結果 Fig. 7의 C그림에서 보는 바와 같이 抗生物質이 檢出되지 않았다. 이것은 꿀의 生産期間 동안 抗生物質을 投與하지 않았음을 示唆하는 것이며 만일 生産適期에 疾病防止用으로 抗生物質 使用時에는 抗生物質이 殘留할 可能性이 있다고 思料된다.

### C. G.C.에 依한 Propionic acid 分析

G.C.에 依한 Propionic acid 分析은 Flowchart 2 및 Table 3과 같은 條件으로 하였다.

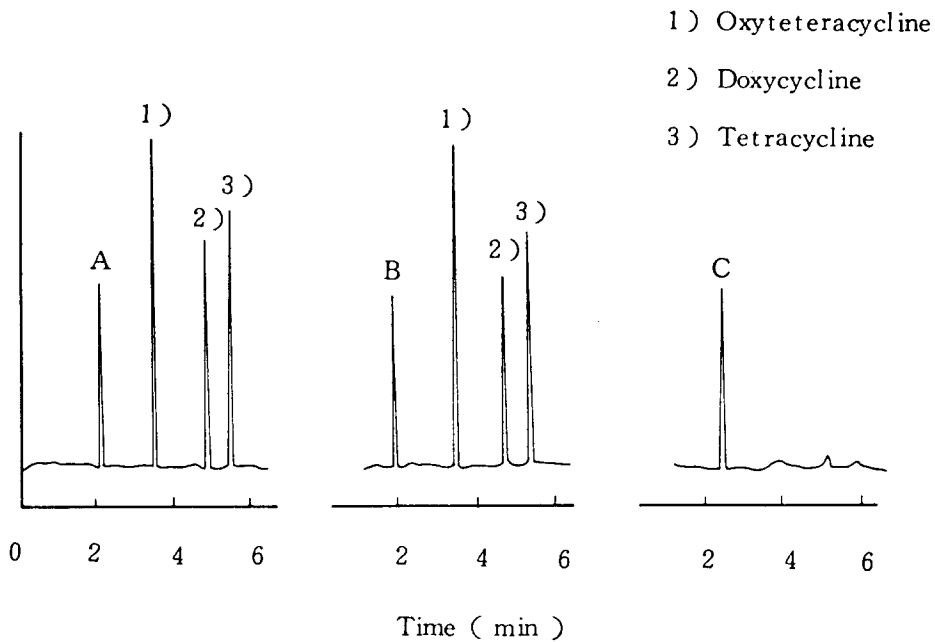


Fig. 7 Typical chromatograms of honey extracts (A) standard TCs(10mg) : (B) honey spiked at 10 mg : (C) blank of honey

1. G.C. Chromatogram

Propionic acid 標準物質 10 ml/l 로 하여 分析한 結果는 Fig 8 과 같으며 Retention time 은 3.5 분이였다.

2. G.C. Chlibration curve 作成

Propionic acid 의 濃度別 標準液(2~10 mg/l)을 20 μl씩 5回 injection 하여 Peak

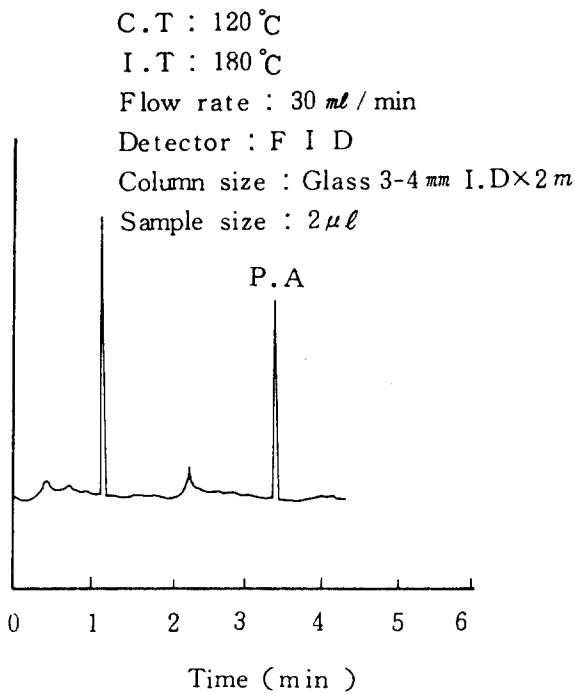


Fig. 8 Separation of propionic acid by G.C.

Area 및 Peak Height 를 Linear expression (一次式)으로 Fig. 9 와 같이 나타내었다.

3. Propionic acid 의 回收率

벌꿀 속에 Propionic acid 標準物質이 10 mg/kg 되게 投入後 Flowchart 2 와 Table 3 과 같은 方法으로 分析한 結果는 Table 6 와 같으며 回收率은 平均 98.3% 이었다.

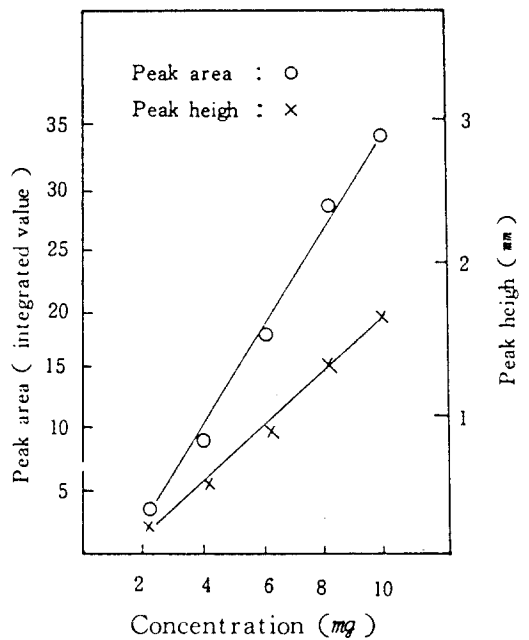


Fig. 9 Calibration curves of propionic acid

Table 6 Recovery rate of propionic acid in honey

Unit : %

Sample No	1	2	3	4	5	AVG
Recovery	97.8	98.8	96.6	98.7	97.7	98.3

#### 4. 벌꿀 中의 Propionic acid 分析

꿀벌에 發生하는 석고병의 疾病防止用으로 Propionic acid 및 그 鹽類를 使用하고 있으며 꿀속에 Propionic acid의 殘留可能性이 있을 것으로 보고 本 實驗에서 試料 100 件의 實驗區에 대해 分析한 結果 Fig 10의 그림 B에서 보는 바와 같이 檢出되지 않았다. 그 原因은 前述한 바와 같이 벌꿀의 生産期間 동안 疾病防止用으로 投與하지 않아 檢出되지 않은 것으로 思料된다.

#### D. 安定性檢討

##### 1. Tetracyclines 抗生物質

Polycycle 構造를 가지고 있는 抗生物質

로써 Chlorotetracycline, Oxytetracycline 및 Tetracycline 은 土壤菌(Soil organism)에서 生成되는 抗生物質을 檢査하다가 發見된 抗生物質이며 Doxycycline 은 近來에 發見한 TCs 이다.<sup>35)~37)</sup>

Tetracyclines 抗生物質은 廣範圍 抗菌劑로서 作用機轉은 Tetracyclines 30 S ribosome 에 結合함으로써 aminoacyl transfer ribonucleic acid(t-RNA)가 50 S ribosomal unit 의 A-site 의 結合을 방해하여 蛋白質合成의 장애를 일으킨다. Tetracyclines 이 選擇的인 毒性을 나타내는 것은 哺乳動物細胞와는 다르게 細菌 細胞膜을 쉽게 透過할 수 있기 때문이다.

副作用 및 毒作用으로는 tetracyclines 의

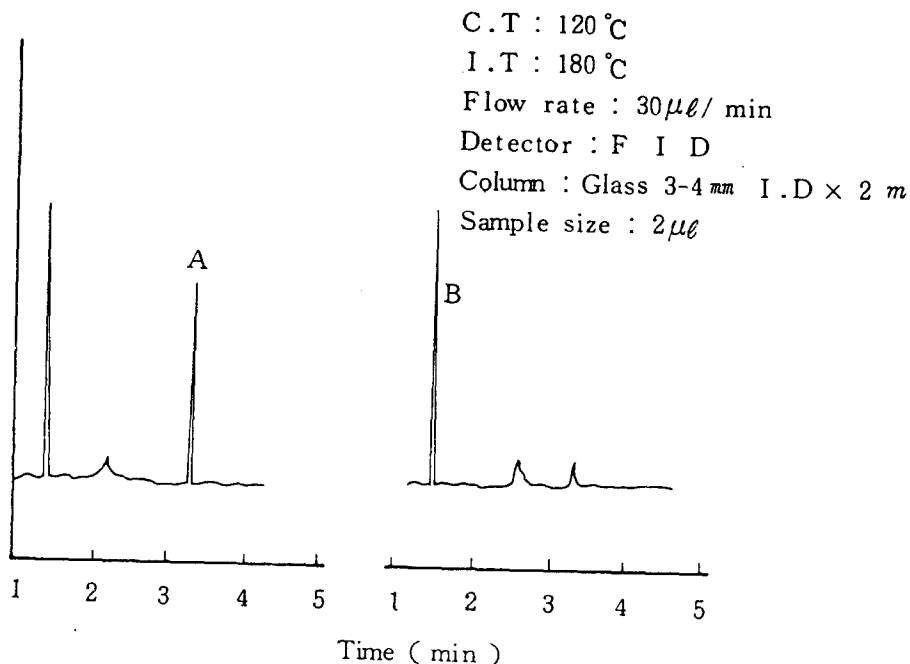


Fig. 10 Typical chromatograms of extracts  
 (A) honey spiked at 10 mg and  
 (B) blank of honey

内服에 의한 消化器系統의 症狀, 即 惡心·嘔吐·上腹部·痛症·泄瀉 등이 흔히 나타나고 口腔炎(stomatitis) 및 舌炎(glossitis)도 가끔 나타나며 靜脈注射하였을 때는 靜脈炎을 일으킬 수도 있다.

Tetracyclines 는 肝臟毒性을 가지고 있으며 特히 腎臟障礙 患者에서 자주 나타난다. 幼兒 및 小兒에게 Tetracyclines 를 投與하였을 때 치아 및 뼈가 黃褐色으로 變하는 現象이 나타나며 이것은 Tetracyclines 이 石灰化(calcification)가 活潑한 곳에 침착되기 때문이다. 따라서 妊産婦나 小兒에는 Tetracyclines 를 投與하지 않도록 하여야 한다.<sup>35),30),35),36),37)</sup>

## 2. Propionic acid 및 그 鹽類

Propionic acid 의 Ca-鹽 및 Na-鹽은 흰색의 結晶 顆粒 또는 粉末로 惡臭가 없으며 天然物에도 含有하는 것이 있다.

抗微生物 效果는 防腐效果는 弱하지만 곰팡이 好氣性孢子形成菌(Bacillus) Gram 陰性菌에 有效하다. 使用은 主로 빵의 防腐劑로 使用되며 使用基準은 2.5 g/kg 以下로 되어 있다. 美國에서는 小麥粉에 대해 0.1~0.2%, 日本에서도 0.3~0.5% 程度의 使用은 無難하다고 되어 있다. 毒性은 弱한 便이다. 쥐에 經口投與한 境遇 急性毒性 LD<sub>50</sub>는 Ca-鹽으로 3.4 g/kg, Na-鹽에서는 5-10 g/kg 이며 Na-鹽 3.5%를 含有한 飼料를 1年間 토끼에 投與한 長期實驗에서 異常이 없었다고 報告되어 있다.

또 LD<sub>50</sub>의 境遇 rat 에 經口投與時는 4, 290 mg/kg, mice intravenous 에는 625 mg/

kg, rabbit 의 經皮에는 500 mg/kg 으로 나타났다.<sup>20),21),25),30),31)</sup>

## IV. 結 果

養蜂飼育 家口數가 每年 增加하고 있으며 꿀의 需要도 增加하고 있다. 그리고 꿀벌은 疾病에 弱하며 集團의으로 生活하기 때문에 各種 疾病에 感染되어 被害를 입을 수 있다. 따라서 그 疾病으로 因한 被害를 防止할 目的으로 使用되고 있는 抗生物質인 OTC, TC, DC 및 Propionic acid 物質이 꿀 속에 殘留할 可能性이 있으므로 “부저병” 및 “석고병” 防止用인 Tetracyclines 와 Propionic acid 가 꿀 속에 殘留할 경우 人體에 比較的 有害하므로 國民保健 增進에 寄與함은 勿論 이들 分野의 基礎資料를 提供하고자 TC 와 P.A 에 대하여 그 分析方法을 開發하였으며 이 方法으로 4 가지 벌꿀(토종꿀, 아카시아꿀, 밤꿀, 잡화꿀)을 對象으로 殘留可能性을 檢討하여 다음의 結果를 얻었다.

1. 꿀 속의 殘留抗生物質 分析은 Bacteriostatic(細菌發育抑制)으로 因하여 微生物學的 方法으로는 不可能하여 HPLC 方法으로 分析可能性을 檢討한 結果 아래와 같다.

- a. 抗生物質인 OTC, TC, DC 의 標準物質을 HPLC 에 依해 分析해 본 結果 防害 Peak 없이 Table 2 의 條件에서 Fig. 3 과 같이 正確하게 分離 可能하다.
- b. 벌꿀 속의 殘留抗生物質 抽出溶媒로는 Methanol, Acetone, Ethylacetate 를 使用하였으나 Methanol, Acetone 에서는

分離不可能하였으며 Ethylacetate 에서  
可能하였다.

- c. Ethylacetate 에 의한 溶媒添加量에 따  
라서 回收率을 보았을 때 溶媒 10 ml  
에서 가장 높아 回收率은 OTC 97%,  
TC 89%, DC 91%로 나타났다.
- d. Calibration curve 는 Kubelka-Munk 式  
에 의해 Linear expression 으로 나타  
내었다.
- e. 꿀 4 種(100 件)에 대하여 TC 殘留量을  
調査한 結果 殘留抗生物質은 檢出되지  
않았다.

2. 꿀 속의 Propionic acid 및 그 鹽類는  
G·C. 方法으로 分析 可能性을 檢討한 結  
果 아래와 같다.

- a. Propionic acid 標準物質을 Table 3 과  
같은 條件으로 G·C. 로 分析한 結果  
Fig. 8 와 같이 Retention time 은 3.50  
분이었다.
- b. 꿀 속의 殘留 Propionic acid 의 抽出은  
Fig. 1 의 蒸留裝置로 抽出하였고 精製  
는 Flowchart 2 方法으로 精製하였다.
- c. 同一한 試料 5 件에 標準物質 10 mg/  
kg 을 投與하여 抽出精製한 後 回收率  
을 본 結果 平均 98.3%로 나타났다.
- d. 꿀 4 種(100 件)에 대하여 P.A. 殘留量  
을 調査한 結果 Propionic acid 는 抽出  
되지 않았다.

3. 以上の 結果에서 꿀 속의 殘留抗生物  
質(OTC, TC, DC) 및 Propionic acid 의 分析  
은 HPLC 와 G·C. 로 可能하였으며 試料  
100 件 中에는 다음과 같이 檢出되지 않았  
다.

- a. HPLC 로 抗生物質 測定時 ppm 單位까  
지는 測定可能하였지만 ppb 單位까지  
는 測定이 不可能하며 本 實驗 結果  
ppm 單位에서는 檢出되지 않았다.
- b. G·C.로 Propionic acid 測定時 試料를  
濃縮하면 ppb 單位까지 測定이 可能하  
며 本 實驗 結果 檢出되지 않았다.
4. 疾病防止 目的으로 使用되고 있는 이  
들 物質이 꿀 生産時期에 使用量이 많을  
時는 可能性이 있을 것으로 思料된다.

## 參 考 文 獻

1. 農水産部：農林水産統計年報, pp. 100  
~101, 1988.
2. 農協中央會：農協中央會統計年報, pp.  
115~118, 1988.
3. 韓國養蜂協會：韓國養蜂總覽, pp. 334  
~347, 1983.
4. 崔承允：養蜂, 꿀벌과 벌통, pp. 252~  
275, 五星出版社.
5. Jonathan W, White JR : Advances in  
Food Research 24, pp. 287~364, Aca-  
demic Press, Inc, 1978.
6. H. Oka, K. Uno : Simple method for  
the analysis of tetracyclines on Silicagel  
high-Perfonmance thin-layer plate. J.  
Chromatography, 260, 1983.
7. H. Oka, K. Uno : Simple method for  
the analysis of tetracyclines, on reve-  
rse-phase thin-layer plates. J. Chroma-  
tography. 1984 ; 284 : 227~234
8. H. Oka, K. Uno. Detection reagents for



- tetracyclines in thin-layer Chromatography. *J. Chromatography*. 1984 ; 295 : 129~139.
9. H. Oka, K. Uno : A Simple method for the analysis of tetra cyclines Using reversed phase high performance liquid Chromatography. *J. Chromatography*. 1984 ; 298 : 435~443
  10. H. Oka, K. Uno : Application 7. propacked C<sup>18</sup> Cartridge for the analysis of tetracyclines residues in animal liver. *J. Chromatography*. 1985 ; 325 : 265~274
  11. H. Oka, K. Uno : Detemination of eight tetracyclines using thin-layer and high performance liquid Chromatography. *J. Chromatography*. 1987 ; 393 : 285~296.
  12. H. Oka, K. Uno : A. Simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandam Cartridge Clean-up system. *J. Chromatography*. 1987 ; 389 : 417~426.
  13. H. Oka, K. Uno : Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey. *J. Chromatography*. 1987 ; 400 : 253~261.
  14. 南原利夫外 1 : 最新高速液體 クロマトグラフィー, pp. 358~441, 廣川書店, 1986
  15. Jonathan W, White JR : Advances in food research. 10, pp. 120~132, Academic Press Inc. 1978.
  16. Sidney Williams : official method of analysis of the A.O.A.C pp. 579~583, Inc, 1984.
  17. 金田一達男 : 花粉による 原因蜜毒の推定, 岩半縣 食品衛生協會. 1982 ; 37~47.
  18. Erick J. Vandamme : Survey of economically important antibiotic compounds and their producer companies, *Biotechnology of imdustrial antibiotics*. 1984 ; 22 : 6~15.
  19. 厚生省 環境衛生局 食品化學課編 : 食品中の食品添加物分析法, pp. 101~120, 講談社, 1983.
  20. 岡村一弘 : 食品添加物の使用法, pp. 60~95, 食品ヒ科學社, 1978
  21. Martha Windholz : *The Merck Index*, p. 8913, Merck & Co, Inc, 1976
  22. 官内尚了外 3 : 畜水産食品に残留する飼料添加用抗生物質の 微生物學的同定法の改良に關する 基礎的研究. *食衛誌*. 22(5) 1981 ; 22(5) : 339~344.
  23. Giorgio Bonaga, et al : chemical composition of Chesmat honey : Analysis of the hydrocarbon fraction. *J. Agri Food. Chem*. 1986 34(2) : 319~326.
  24. 兼松外 4 : 蜂蜜, 異性化糖の各種成分の比較, *營食と食糧*. 1978 ; 31(5) : 507~521
  25. Irving Sunshine : *Handbook of analytical toxicology*, pp. 25~290.
  26. 保健社會部 : 食品公典, pp. 31~32, 이문인쇄사, 1988.
  27. Marcus Kiccus Sowan R. : physical principles of food preservation Dekker, pp. 420~428, AVI, 1975.

28. Desrosior : The technology of food preservation, pp. 246~254, AVI, 1977
29. 樓井房人 : 食品保藏, pp. 115~127. 朝倉書店, 1975.
30. Hodgson & Guthrie : Introduction to Biochemical Toxycology, pp. 304 AVI, 1985.
31. 石館守三外 1. : 食品添加物公定書解説書, pp. 462~476, 廣川書店, 1987.
32. 合村顯雄 : 食品添加物に分析 I. II. pp. 226~280, 講談社, 1987.
33. De Man : Principles of Food Chemistry, p. 118, AVI, 1976.
34. Ray Junk : Hand Book of Sugars, pp. 250~252, AVI, 1973.
35. L.A Mitscher : The chemistry of tetracycline antibiotics, Marcel Dekker, New York and Basle, 1978.
36. Gideon Koren et al. : Antimicrobial therapy in infants & Children MARCEL DEKKER Inc, pp. 287~299, 1988.
37. Victor Lorian : Antibiotics, in Laboratory Medicine Williams & Wikins, p. 167, 1986.