

액체 크로마토그래피를 이용한 벌꿀 중 테트라사이클린계 항생물질의 정량분석 및 잔류조사

이성모¹, 박은정, 홍지영, 김정임, 이정구, 황현순, 김용희

인천광역시 보건환경연구원
(접수 2005. 7. 11. 게재승인 2005. 8. 31)

Determination and survey of tetracyclines residue in honey by high performance liquid chromatography

Sung-Mo Lee¹, Eun-Jeong Park, Jee-Young Hong, Jung-Im Kim, Jung-Goo
Lee, Hyun-Soon Hwang, Yong-Hee Kim

Incheon Metropolitan City Institute of Health & Environment, Incheon 404-251, Korea
(Received 11 July, accepted in revised from 31 August 2005)

Abstract

Oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in honey were separated by solid phase extraction (SPE) and determined with high performance liquid chromatography (HPLC) with UV/Visible detector. Analysis was carried out using following conditions: XTerra C₈ column (3.9 × 150 mm i.d. 5 μm), mobile phase composed of 0.01 M oxalic acid : methanol : acetonitrile (820 : 80 : 100, v/v/v), isocratic pump at a flow rate of 0.9 ml/min, and 50 μl of injection volume, UV/Visible detector with wavelength of 360 nm. The calibration curves of four tetracyclines showed linearity ($r^2 > 0.999$) at concentration range of 100~1,000 ng/ml. The recoveries in fortified honey represented more than 70 % with low coefficient of variation (< 10 %) for concentration range of four tetracyclines. The detection limits for oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline were 13.8, 14.6, 26.2 and 24.9 ng/g in acacia honey, respectively. We also monitored tetracyclines residue in domestic honey [n = 38, acacia (20), wild flower (18)] and foreign honey [n = 22, legally distributed (13), illegally distributed (9)] using modified Charm II screening and HPLC confirmation methods. Seven of the 60 samples (11.7%)

¹Corresponding author

Tel : +82-32-440-6354, Fax : +82-32-576-7785

E-mail : lsm2000@incheon.go.kr

were suspect positive using modified Charm II screening test. Chlortetracycline residue was found in one foreign honey (illegally distributed) tested at concentrations of 0.22 ppm.

Conclusively, for more effective control of tetracyclines used in beekeeping should be further survey for residues in honey and also national guidelines (maximum residue limit : MRL) and methods should be obligatory.

Key words : Tetracyclines, HPLC, Honey

서 론

꿀벌은 각종 식물과 농작물에 화분을 매개하여 품질과 수확량을 향상시키고 자연 생태계를 보호하는 역할을 한다. 또한 양봉은 다른 분야에 비해 경영비가 적게 들고 봉군관리에 노력이 적게 들어 농가의 부업 또는 전업으로 경영이 가능하고 고소득을 얻을 수 있어 예로부터 많은 사람들이 꿀벌을 사육해 왔다. 양봉 생산물인 벌꿀과 로얄제리, 화분 등은 최고의 영양식품이며 봉침액이나 프로폴리스는 의약품으로 활용되고 있다¹⁾. 그러나 꿀벌은 군집생활을 하기 때문에 각종 질병으로 인한 피해가 발생하여 이의 예방 및 치료를 위해 항생제를 사용하고 있으며 과다하게 사용할 경우 최종 산물인 벌꿀에 약제가 잔류되어 인체에 위해를 초래할 우려가 있다.

국내외에서 발생하는 꿀벌의 주요 질병으로는 부저병, 노제마병, 백목병 등으로 테트라사이클린계 약제는 양봉에 있어 세균성 질병인 부저병 치료 목적으로 사용되고 있으며 호주, 캐나다 등의 국가에서는 옥시테트라사이클린에 대한 잔류허용기준 (maximum residue limit : MRL)을 설정하여 관리하고 있다^{2,3)}. 그러나 EU에서는 사용을 금지하고 있으며 벌꿀에 대한 MRL이 설정되어 있지 않으나 벨지움 등 일부 국가에서 자체 실행한계 (action limits)를 설정 운영하고 있다⁴⁻⁶⁾. 국내에서는 꿀벌의 부저병 치료를 위해 테트라사이클린계 항생물질을 허용하고 있으나 벌꿀 중 테트라사이클린계 항생물질의 잔류허용기준 및 공인된 잔류분석법이 없는

실정이다^{7,8)}.

국내 꿀 생산량은 2000년 41,000호 16,509톤으로 세계 생산량의 1.3%로 20위를 기록하고 있으며 수입량은 2000년 296,342kg, 2003년 중국, 미국 등 16개국에서 671,237kg으로 점차 증가하고 있으며 외국 여행중 동남아 등지(태국, 중국 등)에서 구입하여 휴대하고 국내 반입된 꿀도 상당량에 이르고 있는 것으로 추정된다. 이와 같이 국제간 교역과 외국여행의 증가로 벌꿀의 항생물질 오염 등의 안전성 문제가 우려되고 있다^{1,9)}.

국내외에서 벌꿀의 잔류시험법으로는 스크리닝법으로 microbiological assay¹⁰⁾, immunoassay¹¹⁻¹⁵⁾, thin layer chromatography (TLC)¹⁶⁾ 등이 있으며, 정량법으로는 high performance liquid chromatography (HPLC)¹⁶⁻²³⁾, capillary high performance liquid chromatography²⁴⁾, high performance liquid chromatography - mass spectrometry (HPLC-MS)²⁵⁻²⁷⁾ 등의 다양한 방법이 보고되고 있다. 또한 시료 전처리법으로는 고체상추출법 (solid phase extraction : SPE), 액상추출법 (liquid-liquid extraction), 시료고체상 분산처리법 (matrix solid phase dispersion : MSPD) 등이 있는데, 이중 SPE법은 카티리지를 이용, 시료의 정제 및 세척 과정을 거쳐 적합한 용출용매로 원하는 물질을 추출하는 방법으로 간편하고 효율이 좋아 널리 사용된다^{17,18,20,22,23,28)}.

본 연구는 벌꿀에 대한 테트라사이클린계 약제의 잔류분석법을 조사하고 인천지역에 유통되는 벌꿀을 대상으로 항생물질 잔류실태를 확인하였다.

재료 및 방법

시험 재료

2004년 2~5월까지 인천 관내 백화점, 할인매장에서 구입한 국내산 벌꿀 38건 (아카

시아 꿀 20, 잡화 꿀 18)과 인천지역 백화점과 인터넷 쇼핑몰에서 구입한 외국산 꿀 13건, 국외 여행자에 의해 불법 유통되는 외국산 꿀 9건 등 총 60건 (Table 1)을 변형된 Charm II 법¹³⁾으로 count per minute (CPM) 값을 측정하여 양성 반응을 보인 벌꿀을 HPLC로 시험하였다.

Table 1. Sample size of the experiment

Item	Domestic honey (n = 38)		Foreign honey (n = 22)		Total
	Acacia	Wild flower	Legally distributed	Illegally distributed	
No. of tested	20	18	13	9	60
%	33.3	30.0	21.7	15.0	100.0

변형된 Charm II 법을 이용한 간이정성검사

기기 : 미생물수용체를 이용한 Charm II #7600 system (Charm Science Co., USA) 을 사용하였다.

시약 : Charm Science Co. (USA)의 MSU multi-antimicrobial concentrate standard, Tissue performance negative concentrate, MSU extraction buffer, M₂ buffer, Optifluor 및 tetracycline계 kit를 사용하였다.

시료의 전처리 : Charm Sciences Inc.에서 제공한 시험법에 따라 아래와 같이 시험하였다. 요약하면, 벌꿀 1 ml와 MSU extraction buffer 9 ml를 50 ml 원심튜브에 취하여 혼합하고 M₂ buffer 이용하여 pH가 7.5가 되도록 조정하였다. 이어서 흰색 정제시약을 빈 시험관에 넣고 증류수 300 µl를 가하여 약 10초 동안 교반한 후 시료추출액 5 ml를 가하고, orange tablet을 넣은 후 약 15초간 교반하였고, 35℃ 5분간 정치하였다. 그 후 3,300 rpm에서 5분간 원심분리하고 상층액을 제거하고 증류수 300 µl를 넣어 10초간 교반하였다. 측정액 3 ml를 첨가한 후

시험관의 뚜껑을 덮고 혼합한 다음, 1분간 측정하여 CPM(count per minute) 수치를 기록하였다.

시험조작 및 판정

Positive값 설정은 Charm Sciences Inc.에서 제공한 시험법 중 양성대조시료를 아래와 같이 변형하여 시험하였다.

① 음성표준물질 (negative control) : MSU extraction buffer로 Tissue performance negative concentrate를 희석시킨 후 잘 섞었다.

② 양성표준물질 (positive control) : MSU extraction buffer로 MSU multi-antimicrobial concentrate standard를 희석시킨 후 잘 섞었다.

③ 완충액 (buffers) : MSU extraction buffer 및 M₂ buffer는 각 부착된 라벨지시에 따라 희석하여 완충액을 조제하였다.

④ 음성대조시료의 준비 (negative control for performance monitoring) : ①에서 조제한 negative control 2 ml에 MSU extraction buffer 6 ml를 넣어 균일하게 혼합한 후 사용하였다.

⑤ 양성대조시료의 준비 (positive control for performance monitoring) : ②에서 조제한 positive control 0.3 ml에 negative control 6ml를 혼합하여 희석하였다. 희석액 2ml와 MSU extraction buffer 15ml를 넣어 혼합한다. 사용 할 때에는 실온에 도달되도록 하였다.

⑥ Charm II #7600 system으로 positive control-tetracyclines 값을 측정하여 양성 값에 20%를 더한 값을 control point (CP)값으로 하였고, 이때 CP값보다 낮으면 양성, CP값보다 높으면 음성으로 하였다.

HPLC를 이용한 정밀정량검사

기기 : 전처리에 이용된 기기로는 Vacuum manifold (Supelco), Vacuum pump (Savante)를 사용하고 자외선검출기가 장착된 액체크로마토그래피 (Spectra system UV4000, TSP, USA)를 이용하였다.

표준품 및 시약 : 테트라사이클린계 표준품 oxytetracycline (OTC), tetracycline (TC), chlortetracycline (CTC) 및 doxycycline (DC)은 Sigma사(USA) 제품을 사용하였고, 분석에 사용된 methanol, acetonitrile 및 증류수는 HPLC급을, Na₂EDTA, anhydrous sodium phosphate dibasic, citric acid monohydrate, oxalic acid 등 시험에 사용된 모든 시약은 특급 이상의 수준을 사용하였다.

Solid phase extraction (SPE) cartridge : Sep-Pak tC₁₈ (500 mg, Waters Co.)과 Bakerbond SPE (COOH) (500 mg, J.T. Baker Co.)를 사용하였다.

0.1M Na₂EDTA-McIlvaine buffer: Sodium phosphate, dibasic 28.4 g을 증류수에 녹여 1 l로 하고, citric acid 21.0 g을 증류수에 녹여 1 l로 하였다. Anhydrous sodium phos-

phate, dibasic 용액 625 ml와 citric acid 용액 1 l를 혼합한 후 0.1N NaOH 또는 0.1N HCl를 가하여 pH 4.0 ± 0.05로 조정하고 이 용액 1,625 l에 Na₂EDTA 60.5 g을 가하여 녹였으며, 용액은 매주 만들어 사용하였다.

표준용액 조제 : 테트라사이클린계 표준품 10 mg을 각각 취하여 100 ml 갈색 용량 플라스크에 넣고 methanol에 완전히 녹인 다음 100 µg/ml 농도로 만들어 표준원액 (stock solution)으로 하였다. 또 표준원액을 이동상 용매로 희석하여 10 µg/ml 농도로 만들어 표준용액으로 하였으며, 이들 표준용액은 냉장보관하면서 14일간 사용하였다.

표준곡선 작성 : 테트라사이클린계 표준용액 (10 µg/ml)을 100 ml 갈색 용량 플라스크에 10, 5, 3, 2, 1 ml씩 취하고 이동상으로 표시선까지 채워 1.0, 0.5, 0.3, 0.2, 0.1 µg/ml로 희석하였다. 6개 농도의 희석된 표준용액을 50 µl씩 주입하여 얻은 크로마토그램에서 각각의 테트라사이클린계 항생물질에 대한 농도별 평균면적을 구하여 X축을 농도, Y축을 면적으로 하여 표준곡선을 작성하였다.

시료의 전처리 : 벌꿀 5.0g을 칭량하여 50 ml 원심튜브에 넣고 0.1M Na₂EDTA - McIlvaine buffer 20 ml에 녹여서 균질화한 후 methanol, 증류수, 포화 Na₂EDTA 용액 10 ml씩으로 미리 활성화 시킨 Sep-Pak tC₁₈에 통과시키고, Sep-Pak tC₁₈을 증류수로 세정한 후 진공상태에서 5분간 건조하고 methanol 10 ml로 용출하였다. 이 용출액을 Bakerbond SPE (COOH)를 통과시킨 후 methanol 10 ml로 세정하고 0.01M oxalic acid와 acetonitrile 혼합용액 (4 : 1) 5 ml로 용출하고 0.45 µm acrodisc로 여과하여 HPLC용 시험용액으로 사용하였다 (Fig 1).

분석조건 : XTerra C₈ (Waters, 3.9 × 150 mm id, 5 μm) 컬럼을 사용하였고 이동상 용매는 0.01M oxalic acid, methanol, acetonitrile의 혼합용액 (820 : 80 : 100, v/v/v)을 Whatman 0.45 μm 필터로 여과하여 사용하였으며, 검출 파장은 자외부 360 nm, 유속은 0.9 ml/min.으로 측정하였다.

이동상은 oxalic acid 1.26 g을 증류수 1 l 에 녹인 후 이 용액 820 ml와 methanol 80 ml, acetonitrile 100 ml를 잘 혼합한 다음 용매 여과 장치 (Millipore, 0.45 μm membrane filter)로 여과하여 이동상으로 사용하였다.

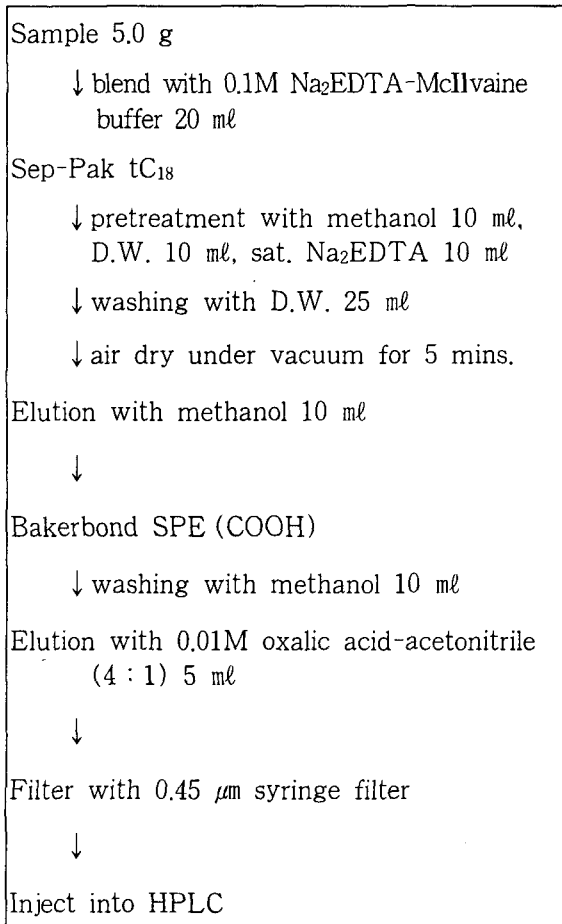


Fig 1. Flow chart of sample preparation of tetracyclines in honey

결과 및 고찰

HPLC의 표준곡선

표준용액을 각각 100~1,000 ng/ml의 농도범위에서 HPLC에 주입하여 자외선검출기로 측정하였을 때 OTC, TC, CTC, DC 4종 모두에서 상관계수 0.999 이상의 양호한 직선성을 나타내었다 (Fig 2).

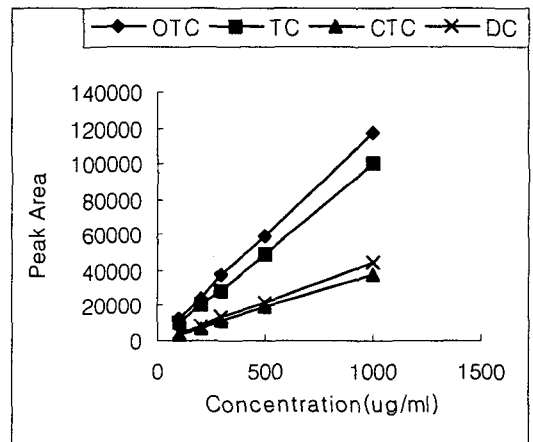


Fig 2. Standard calibration curves of four tetracyclines ($r^2 > 0.999$)
 OTC : oxytetracycline
 TC : tetracycline
 CTC : chlortetracycline
 DC : doxycycline

HPLC 크로마토그램과 벌꿀의 회수율

테트라사이클린계 항생물질 4종에 대한 HPLC 크로마토그램은 Fig 3에서 보는 바와 같았다. 4종 혼합표준용액을 500 ng/g의 농도로 아카시아꿀 및 잡화꿀에 첨가하여 추출, 정제하여 HPLC로 분석하였을 때 음성시료와 첨가시료 사이에 표준용액과 동일한 분리도를 나타냄을 확인할 수 있었다 (Fig 3 및 4).

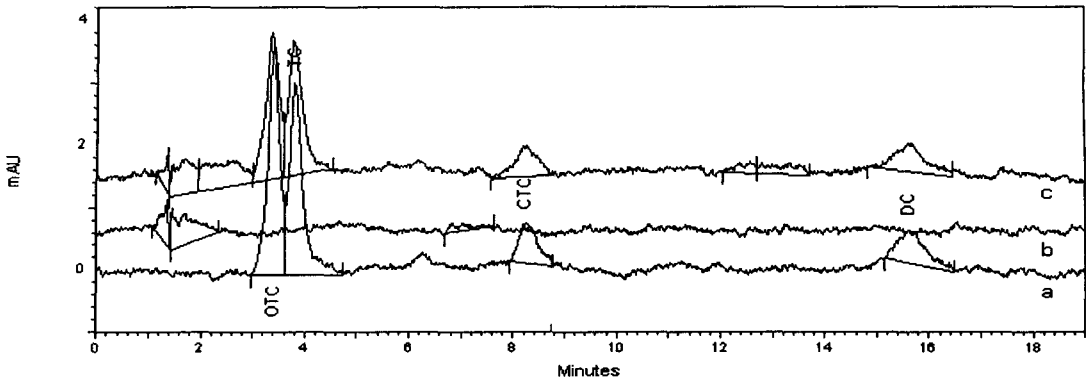


Fig 3. Chromatograms of four tetracyclines.
 a: 500 ng/g of four tetracyclines standard, b: blank acacia honey, c: acacia honey fortified with 500 ng/g of four tetracyclines. (OTC : oxytetracycline, TC : tetracycline, CTC : chlortetracycline, DC : doxycycline)

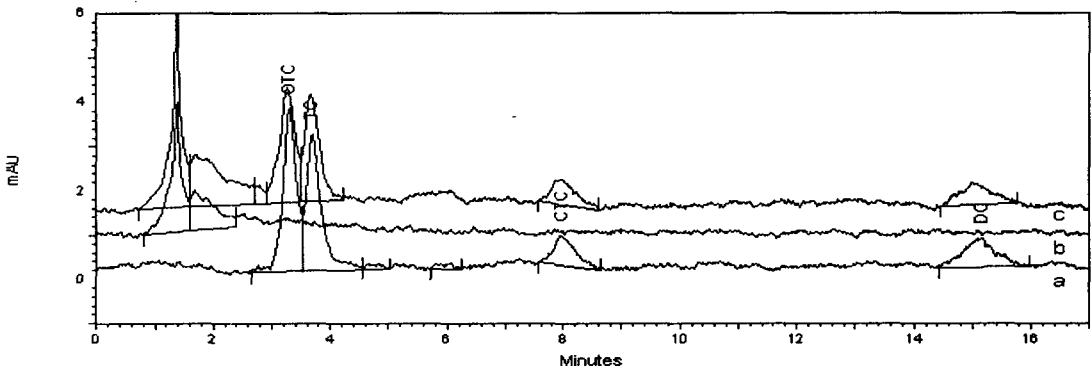


Fig 4. Chromatograms of four tetracyclines.
 a: 500 ng/g of four tetracyclines standard, b: blank wild flower honey, c: wild flower honey fortified with 500 ng/g of four tetracyclines. (OTC : oxytetracycline, TC : tetracycline, CTC : chlortetracycline, DC : doxycycline)

정확도 및 정밀도를 확인하기 위하여 Charm II 법을 실시하여 테트라사이클린계 항생물질이 잔류되지 않은 것으로 확인된 아카시아꿀과 잡화꿀을 선별하여 0.1~0.5 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 첨가한 후 회수율을 측정함 결과 아카시아꿀에서 OTC 71.4~81.1%, TC 71.2~85.3%, CTC 71.8~83.7%, DC 72.0~85.0%로 나타났고 실험실내 평균 변이계수 (CV)는 4.3~6.6%이었다(Table 2). 잡화꿀에서 OTC 73.8~86.5%, TC 76.6~89.0%, CTC 73.8~84.8%, DC 73.2~85.6%로 나타

났고 실험실내 평균 변이계수(CV)는 3.2~4.9% 범위였다 (Table 3).

이와 같은 결과는 Codex의 권장범위가 회수율로서 100 ppb이상일 경우 80~110%인 점과 Oka 등¹⁶⁾의 회수율 83.7~99.6%(CV 0.9~4.3), 구 등²⁰⁾이 벌꿀에서 0.5 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 첨가한 후 자외선 검출기로 측정함 결과 평균 회수율이 아카시아꿀 86.8~99.5%, 잡화꿀 76.8~97.4%등을 감안할 때 다소 낮은 회수율을 보였으나, 김²²⁾의 보고는 0.1~1.0 $\mu\text{g/g}$ 의 농도로 첨가한 후 회수

율이 OTC 78.09~87.1%, TC 74.18~88.11%, CTC 68.4~80.23%, DC 62.77~79.44%로 본 조사와 유사한 결과를 보였다. 이와 같이 회수율의 차이는 벌꿀의 종류, 분석 대상물질 및 전처리법, 검출기의 종류,

업무자의 숙련도 등의 여러 원인에 따른 결과로 사료된다. 따라서 보다 좋은 회수율을 얻기 위해서는 좀 더 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

Table 2. Recoveries and coefficient of variation of four tetracyclines in spiked acacia honey

Tetracyclines	Recovery rate (% , mean±S.D., n=5)				Coefficient of variation (%)			
	0.1 µg/g	0.3 µg/g	0.5 µg/g	Mean	0.1 µg/g	0.3 µg/g	0.5 µg/g	Mean
Oxytetracycline	71.4±6.6	81.1±3.8	75.3±3.6	75.9±4.7	9.3	4.7	4.8	6.3
Tetracycline	71.2±4.5	85.3±2.6	79.9±4.0	78.8±3.7	6.4	3.0	5.0	4.8
Chlortetracycline	71.8±3.6	83.7±2.6	78.8±3.6	78.1±3.3	5.1	3.1	4.6	4.3
Doxycycline	72.0±6.7	85.0±5.5	82.4±3.4	79.8±5.2	9.3	6.4	4.1	6.6

Table 3. Recoveries and coefficient of variation of four tetracyclines in spiked wild flower honey

Tetracyclines	Recovery rate(% , mean±S.D., n=5)				Coefficient of variation(%)			
	0.1 µg/g	0.3 µg/g	0.5 µg/g	Mean	0.1 µg/g	0.3 µg/g	0.5 µg/g	Mean
Oxytetracycline	73.8±2.2	81.5±3.9	86.5±1.7	80.6±2.6	2.9	4.8	2.0	3.2
Tetracycline	76.6±1.7	83.9±5.5	89.0±5.2	83.2±4.1	2.2	6.5	5.9	4.9
Chlortetracycline	73.8±3.5	81.7±3.2	84.8±3.5	80.1±3.4	4.7	3.9	4.1	4.2
Doxycycline	73.2±3.6	83.0±3.3	85.6±1.6	80.6±2.8	4.9	4.0	1.9	3.6

검출한계 및 정량한계

벌꿀에서 테트라사이클린계 항생물질 4종에 대한 검출한계와 정량한계는 아카시아꿀에서 각각 OTC 13.8 ppb, 22.1 ppb, TC 14.6 ppb, 23.4 ppb, CTC 26.2 ppb, 51.9 ppb, DC 24.9 ppb, 49.3 ppb, 잡화꿀에서 각각 OTC 14.3 ppb, 22.9 ppb, TC 15.2 ppb, 24.3 ppb, CTC 26.9 ppb, 53.3 ppb, DC 25.2 ppb, 49.9 ppb 수준으로 정량할 수 있었다 (Table 4). 구 등²⁰⁾의 조사에서 자외선검출기를 이용한 분석법의 검출한계는 OTC와 TC는 0.01 ppm, CTC와 DC는 0.02 ppm이었고, 형광검출기를 이용한 분석에서는 OTC와 TC는 0.01 ppm, CTC와 DC는 0.05 ppm이었다.

또한 Vinas 등¹⁷⁾은 15~30ppb, Oka 등¹⁸⁾은 OTC, TC 20 ppb, CTC, DC 50 ppb으로 보고하였다.

검출한계는 검사방법에 따라 다양하여 스크리닝법으로 이용되는 TLC¹⁶⁾는 0.1 ppm 수준이나 정량법으로 capillary HPLC법²⁴⁾은 HPLC법 보다 100배 이상 높은 감도(0.5 ppb)를 보이며, LC/MS법은 1~4 ppb로 보고되고 있다²⁶⁾. 이와 같이 검출한계와 정량한계의 차이는 검사방법과 벌꿀의 종류, 분석 대상물질, 전처리법, 검출기 종류 및 파장, 이동상 용매 등 분석 조건의 차이에 따른 것으로 판단되며 본 시험결과는 국내외 조사와 유사한 결과를 보였다^{17,18,20)}

Table 4. Limit of detection(LOD) and limit of quantification (LOQ) of four tetracyclines in acacia and wild flower honey

Tetracyclines	Acacia honey		Wild flower honey	
	LOD* ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ** ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Oxytetracycline	13.8	22.1	14.3	22.9
Tetracycline	14.6	23.4	15.2	24.3
Chlortetracycline	26.2	51.9	26.9	53.3
Doxycycline	24.9	49.3	25.2	49.9

LOD* : Blank determination + 3*SD, LOQ** : Blank determination + 6*SD, N=20

벌꿀 중 테트라사이클린계 약제 잔류 4, 외국산꿀 2개이었고 HPLC로 정량검사 결과 국내산 잡화꿀 1개에서 OTC 0.02 ppm, 불법유통 되는 외국산꿀 1종에서 CTC 0.22 ppm으로 검출되었다 (Table 5). 그러나 Charm II 법으로 스크리닝 검사한 결과 양성 반응을 보인 벌꿀은 아카시아꿀 1, 잡화꿀

Table 5. Residues of tetracyclines in domestic and foreign honey

Items	Domestic honey		Foreign honey		Total (n = 60)
	Acacia (n = 20)	Wild flower (n = 18)	Legally distributed (n = 13)	Illegally distributed (n = 9)	
Screening method*	1(1.7)	4(6.7)	1(1.7)	1(1.7)	7(11.7)
HPLC	-	1(1.7)	-	1(1.7)	2(3.4)
Concentration of tetracyclines					
oxytetracycline(ppm)	-	0.02	-	-	
chlortetracycline(ppm)	-	-	-	0.22	

* Modified Charm II method, n=number of honey

Data is represented as number of detected sample and detection rate(%)

EU(2001)에서 동물약품 잔류 양성률을 조사한 결과 어류 1%, 식육 0.13~0.56%이 었으나 벌꿀에서는 5.3%로 높은 비율을 보 이고 있다²⁹⁾. 또한 벌꿀 중 테트라싸이클린 계 항생물질 검출율은 2002년 영국에서 5% 로 OTC 37 ppb, TC 73 ppb 수준이 검출되 었으며³⁰⁾, 2000년 캐나다에서 자체 양봉농가 를 대상으로 검사 결과 총 131농가 중 2농가 에서 20 ppb가 초과되어 검출되었고³⁾, Heering 등¹²⁾은 1998년 유럽, 아시아, 대양

주, 미주 등이 원산지인 꿀에서 12%(50 ppb이상)의 검출보고를 하는 등 많은 국가 에서 검출되고 있다^{4,5,14,15,31)}.

국내 조사결과는 한국소비자보호원³²⁾, 전 21), 구 등²⁰⁾의 조사에서는 검출되지 않았으 나 김²²⁾의 1996년 보고에 따르면 광주광역 시에서 유통되는 꿀 50건 중 총 16건이 검 출(OTC 0.09~4.0 ppm 9건, CTC 0.1~2.0 ppm 7건) 되었다. 이와 같이 보고자에 따른 조사 결과의 차이는 검사 방법과 공시시료

수거 장소 및 시기 등의 차이와 테트라사이클린계 항생물질이 열과 빛에 불안정해 고온에서 오래 보관시 소실되기 때문으로 사료된다²³⁾. 그러므로 국내에서도 벌꿀 중에 항생제 오염이 우려되고 있으며 특히 외국에서 불법 반입되는 벌꿀의 안전성이 문제점으로 대두되고 있다. 최근 동물약품의 오·남용으로 인해 식품산업 전반에 사회문제가 되고 있어 천연산물인 양봉산물에서 항생제 잔류문제가 발생하지 않도록 양봉가들은 투약농도 및 휴약기간 등을 준수해야 하며 생산자 단체에서는 시장 출하전에 사전 검사를 하여야 할 것이다^{6,7)}.

본 실험에서 이용한 Charm II 법은 HPLC 정량한계 및 위양성(false positive) 등을 고려하여 양성대조시료(Positive Control)의 농도를 변경하여 실험하였다. Charm II 법은 검사시간이 20분 이내로 신속한 결과를 얻을 수 있으나 위양성 등 비특이성이 발생되어 간이검사법으로 사용되며 반드시 HPLC법 등의 정량법에 의한 최종 검사가 필요하다^{4,14,15)}. 그리고 이와 같이 벌꿀 중 잔류가능성이 높은 테트라사이클린계 항생물질 중 OTC, TC, CTC, DC를 방해피크 없이 동시에 분석하기 위해 SPE cartridge 정제 등 전처리법, 검출기 종류 및 파장, 이동상 용매 등 분석 조건에 대한 보다 많은 연구가 이루어져야 하며 벌꿀에 대한 항생물질 잔류허용기준 및 검사법의 제정이 필요하다 하겠다.

결 론

벌꿀중 테트라사이클린계 항생물질 4종 (oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline, doxycycline)에 대하여 Sep-pak cartridge를 이용한 시료의 정제, 추출과정을 거쳐 자외선검출기가 장착된 액체크로마토그래피로 동시분석을 실시하였다. 컬럼은 XTerra C₈ (Waters, 3.9×150 mm id, 5 μm), 이동상 용매는 0.01M oxalic acid, methanol, acetonitrile의

혼합용액(820 : 80 : 100, v/v/v), 검출파장은 360 nm, 유속 0.9 ml/min.으로 측정하였을 때 모두에서 상관계수 0.999 이상의 직선성을 나타내었다.

0.1~0.5 μg/g으로 첨가한 벌꿀의 평균 회수율은 아카시아꿀에서 oxytetracycline 71.4~81.1%, tetracycline 71.2~85.3%, chlortetracycline 71.8~83.7%, doxycycline 72.0~85.0%이었고 실험실내 평균 변이계수(CV)는 4.3~6.6%이었으며, 잡화꿀에서는 다소 높은 회수율을 보였다. 검출한계 및 정량한계는 아카시아꿀에서 각각 oxytetracycline 13.8 ppb, 22.1 ppb, tetracycline 14.6 ppb, 23.4 ppb, chlortetracycline 26.2 ppb, 51.9 ppb, doxycycline 24.9 ppb, 49.3 ppb이었으며 잡화꿀에서는 아카시아꿀과 유사한 결과를 보였다.

인천 지역에서 유통되는 국내산 벌꿀 38건 (아카시아꿀 20, 잡화꿀 18)과 인천지역 백화점과 인터넷쇼핑몰에서 구입한 외국산 꿀 13건, 국외 여행자에 의해 불법 유통되는 외국산 꿀 9건 등 총 60건을 변형된 Charm II 법과 HPLC 검사 결과 불법유통 되는 외국산 1종에서 chlortetracycline 0.22 ppm이 검출되었다.

참고문헌

1. 농협중앙회. 2003. 꿀벌사육시설과 관리 (국내외 양봉산업의 현황과 전망). 대한인쇄사, 서울 : 7-32.
2. McKee B. 2003. Prevention of residues in honey : a future perspective. *APIACTA* 38 : 173-177.
3. Kendall J, Noot D, Ehmann M. 2003. Surveillance of selected antimicrobial residues in the 2000 Alberta honey crop. *Animal Health Forum* 8(4) : 6.
4. Reybroeck W. 2003. Residues of antibiotics and sulphonamides in honey on the Belgian market. *APIACTA* 38 : 23-30.

5. Sabatini AG, Carpana E, Serra G, et al. 2003. Presence of acaricides and antibiotics in samples of Italian honey. *APIACTA* 38 : 46-49.
6. Mutinelli F. 2003. Practical application of antibacterial drugs for the control of honey bee diseases. *APIACTA* 38 : 149-155.
7. 사단법인 한국동물약품협회. 2001. 동물용 의약품등 편람. 성남 : 995-1141.
8. 한국식품공업협회. 2001. 식품공전. 문영사, 서울 : 461-466.
9. 식품의약품안전청. 2004. 수입식품등 검사 연보.
10. Khismatoullin R, Kuzyaev R, Lyapunov Y, et al. 2003. Modification of microbiological detection method of tetracycline in honey. *APIACTA* 38 : 246-248.
11. Ferguson JP, Baxter GA, McEvoy JD, et al. 2002. Detection of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk, honey and meat samples using an optical biosensor. *Analyst* 127(7) : 951-956.
12. Heering W, Usleber E, Dietrich R, et al. 1998. Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. *Analyst* 123(12) : 2759-2762.
13. Charm Sciences Inc. 2004. Charm II test for antimicrobial drugs in honey : Beta-lactams, Tetracyclines, and Chloamphenicols operator's manual. 1-13.
14. Salter R. 2003. Charm II system - comprehensive residue analysis system for honey. *APIACTA* 38 : 198-206.
15. Morlot M, Beaune P. 2003. An experience with Charm II system. *APIACTA* 38 : 226-234.
16. Oka H, Ikai Y, Kawamura N, et al. 1987. Improvement of chemical analysis of antibiotics (XII. Simultaneous analysis of seven tetracyclines in honey). *J Chromatogr* 400 : 253-261.
17. Vinas P, Balsalobre N, Lopez-Erroz C, et al. 2004. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the analysis of tetracycline residues in honey. *J Chromatogr A* 1022 (1-2) : 125-129.
18. Oka H, Ikai Y, Kawamura N, et al. 1987. Improvement of chemical analysis of antibiotics (IX. A simple method for residual tetracyclines analysis in honey using a tandem cartridge clean-up system). *J Chromatogr* 389 (2) : 417-426.
19. Galeano D, Guiberteau C, Salinas F. 1990. Rapid determination of sulfathiazole, oxytetracycline and tetracycline in honey by high-performance liquid chromatography. *Anal Lett* 23 : 607-616.
20. 구용의, 강민철, 이선화 등. 2000. 벌꿀제품에 있어서 잔류항생물질에 관한 조사연구. 식품의약품안전청연구보고서 4 : 78-89.
21. 전상수. 1990. 벌꿀중의 잔류항생물질 및 propionic acid 분석에 관한 조사연구. 인제대학교보건대학원 석사학위논문.
22. 김진아. 1996. 벌꿀중의 sulfonamide제와 tetracycline제의 잔류수준 분석에 관한 연구. 전남대학교대학원 석사학위논문.
23. 김재길, 손재형, 이수한. 1993. Tetracycline 류 항생제의 온도에 따른 벌꿀내 잔류성에 관한 연구. 한국양봉학회지 8(2) : 133-139.
24. Huang HN, Chen TB, Chen RM, et al. 1999. Detection of residual antibiotics in honey by capillary high performance liquid chromatography. *Se Pu* 17(6) : 588-589.

25. Oka H, Ito Y, Ikai Y, et al. 1998. Mass spectrometric analysis of tetracycline antibiotics in foods. *J Chromatogr A* 812(1-2) : 309-319.
26. Nakazawa H, Ino S, Kato K, et al. 1999. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 732(1) : 55-64.
27. Kaufmann A, Roth S, Ryser B, et al. 2002. Quantitative LC/MS-MS determination of sulfonamides and some other antibiotics in honey. *J AOAC Int* 85(4) : 853-860.
28. Bogdanov S. 2003. Current status of analytical methods for the detection of residues in bee products. *APIACTA* 38 : 190-197.
29. Institut for Fødevarsikkerhed og Ernæring. 2002. Veterinære lægemiddelrester i fødevarer 2001 - resultater fra den danske kontrol med veterinære lægemiddelrester. 8.
30. Veterinary Residues and Committee. 2003. Annual report on surveillance for veterinary residues in food in the UK, 2002. 28-31.
31. Pineiro MScAP. 2003. Residues control in Cuban honey. *APIACTA* 38 : 58-62.
32. 한국소비자보호원. 2002. 벌꿀의 안전성 실태조사. 한국소비자보호원 연구보고서