

Nonitoring of amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole in honey samples sold in 2011

Eun Man Lee and Jae Jeong Ryoo^{1,*}

Daegusangwon Highschool, 241, Wolbae-ro, Dalseo-gu, Daegu 704-808, Korea

¹Department of Chem. Education, Kyungpook National University, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea

(Received October 18, 2012; Revised January 16, 2013; Accepted January 16, 2013)

2011년 시판된 벌꿀 중 amtraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole 모니터링

이원만 · 류재정^{1*}

대구상원고등학교, ¹경북대학교 화학교육과

(2012. 10. 18. 접수, 2013. 1. 16. 수정, 2013. 1. 16. 승인)

Abstract: It was known that many beekeepers use some acaricides to protect their bees. Among the acaricides used in bees, amitraz, bromopropylate, coumaphos, and cymiazole were used commonly in Korea. In middle of 2006, Korean government set maximum residual limit (MRL) of amitraz and coumaphos as 0.2 ppm and 0.1 ppm, respectively. Because the environment of bee farm changes every year, it is needed to monitor acaricides in honey continuously. In this work, ten samples of honey collected from local markets and internet in 2011 were tested for determination of the amount of amitraz, bromopropylate, coumaphos and cymiazole by HPLC-DAD. Levels of the acaricide residues found were less than 25 ppb.

요 약: 많은 양봉업자들이 그들의 벌을 보호하기 위해 동물성 의약품들을 사용한다. 우리나라에서 벌에 사용되는 동물성 의약품은 아미트라즈, 브로모프로필레이트, 쿠마포스, 시미아졸 등이다. 2006년 중반에 한국 정부에서는 아미트라즈와 쿠마포스의 최대잔류허용기준을 각각 0.2, 0.1 ppm으로 설정하였다. 해마다 양봉환경이 변하고 있으므로 꿀 속의 동물성 의약품들에 대한 지속적인 모니터링이 필요하다. 본 연구에서는 2011년에 지역시장이나 인터넷을 통해 모은 10개 벌꿀 시료들에 대하여 아미트라즈, 브로모프로필레이트, 쿠마포스, 시미아졸 잔존량을 HPLC-DAD로 조사하였다. 조사한 10종의 벌꿀에서는 살충제로 사용되는 이들 성분이 25 ppb 이상으로는 검출되지 않았다.

Key words: monitoring, acaricide, honey, HPLC

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)53-950-5907 Fax : +82-(0)53-950-5899

E-mail : jjryoo@knu.ac.kr

1. 서 론

벌꿀은 5가지의 당류(포도당, 과당, 자당, 올리고당, 맥아당)와 17종의 아미노산, 10종의 비타민류, 12종의 미네랄, 21%의 수분, 유기산 등으로 구성되어 영양이 풍부하나, 벌꿀에 항생제 및 살충제 등의 위해물질이 검출되고 있다는 보고가 알려짐에 따라 소비자들의 불안감이 증대하고 있다.¹ 벌꿀에 남아있는 위해 화학물질의 가능한 오염 경로는 크게 두 가지가 있다. 첫째로 역병을 조절하기 위해서 사용된 화학물질이 토양이나 수질 등에 잔류하게 되고, 이 토양이나 수질에 의해 꿀벌이 오염된 후 벌꿀에 함유되는 경로가 있다.² 둘째로는 벌꿀의 유충에 영향을 미치는 여러 가지 질병-American foulbrood (*Paenibacillus larvae*), European foulbrood (*Melissococcus plutonius*), Chalkbrood (*Ascosphaera apis*)-과 기생충-Nosema (*Nosema apis*), amoeba (*Malpighamoeba mellifica*), varroa mites (*Varroa Jacobsoni*), tracheal mites (*Acarapis woodi*)-을 치료하기 위해서 벌집에 동물성의약품을 처리하고, 이것이 꿀벌을 오염시켜서 결국 벌꿀에 포함되는 경로가 있다.³ 이로 인해 각 나라에서는 동물성의약품에 대해 최대잔류허용기준 (MRL)을 정하여 규제하고 있으며 그 값은 Table 1과 같다.

Table 1에서 보듯이, EU에서는 amitraz, coumaphos,

cymiazole의 MRL을 0.2, 0.1, 1 mg/kg으로 정하고 있다.⁴ 반면에 미국 환경청(The US Environmental Protection Agency, EPA)에서는 amitraz, coumaphos, fluvalinate의 MRL을 1, 0.1, 0.05 mg/kg으로 각각 설정하고 있다.⁵ 한편, bromopropylate의 경우 EU와 미국에서는 MRL 설정치가 없는 약품으로 분류되어 있지만 독일이나 스위스는 1 mg/kg, 이탈리아의 경우 0.01 mg/kg으로 MRL을 설정하고 있다.⁶ 우리나라에서는 벌꿀에 잔류하는 동물용의약품에 대한 잔류허용기준을 amitraz와 coumaphos에 대하여 각각 0.2 mg/kg, 0.1 mg/kg, fluvalinate와 flumethrin에 대하여 각각 0.05 mg/kg, 0.1 mg/kg으로 정하고 있다. 또한 2010년부터는 식품의 기준 및 규격과 국제식품규격위원회에 잔류기준이 없는 동물용의약품 중 항생물질 및 합성항균제에 대하여 벌꿀(로알젤리, 프로폴리스 포함)의 잔류기준을 0.03 mg/kg으로 적용하고 있다.⁷

살충제 중에서 벌꿀 속에 잔류 가능성이 큰 것은 amitraz, cymiazole, bromopropylate, coumaphos, flymethrin 그리고 fluvalinate이다. Amitraz는 살충제 및 진드기 구충제로 널리 이용되며, 국내에서도 양봉용에 응에 방제용으로 혼연 형태로 사용되고 있다. “바로캣트 혼연지”라는 제품명으로 1개가 허가되어 있으며 1봉군 1회 1매를 점화하여 벌통소문으로 넣어서 사용

Table 1. Toxicity categories, acute LD₅₀ in rats, and maximum regulated residual limits in frequently used substances for bee diseases control

Insecticide	Toxicity category	Acute LD ₅₀ values (mg/kg)		Maximum residual limit(MRLs) in honey (mg/kg)						
		Oral	Dermal	EU ^a	USA ^b	Germany ^c	Switzerland ^c	Italy ^c	Netherlands ^c	South Korea ^d
Amitraz ^e	III ^h	523-800	>1600	0.2	1	0.01	0.01	0.01	0.02	0.2
Coumaphos	II ^g	13-41	860	0.1	0.1	n.f.	0.01	n.f.	0.05	0.1
Cymiazole		725	>3100	1	f	0.01	n.f.	0.01	n.f.	f
Bromopropylate		2784-3880	>10000	f	f	1	1	0.01	n.f.	f
Flumethrin		258	>150	f	f	0.01	0.05	0.01	n.f.	0.01
Fluvalinate	II ^g	261-282	>20000	f	0.05	0.01	n.f.	0.01	0.05	0.05
Imidachloprid	II ^g -III ^h	450	>5000	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.
Fipronil	II ^g	296	374	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.	n.f.

n.f. : not found

^aCouncil regulation No 2377/90/EEC and their subsequent modifications.

^bFood and Drug Administration of the United States. Pesticides tolerances (<http://www.cfsan.fda.gov> 2003).

^cA review of treatment options for control of varroa mite in New Zealand. Report to the Ministry of Agriculture and Forestry(<http://www.biosecurity.govt.nz>, 2005).

^dKorea food and drug administration (<http://www.kfda.go.kr> 2009).

^eSum of amitraz and all metabolites containing the 2,4-dimethylaniline moiety, expressed as amitraz.

^fDo not have a MRL.

^gModerately hazardous

^hSlightly hazardous

되고 있다. Bromopropylate는 진드기 구충제로 농산물의 살충제로 이용되며, 양봉용으로는 꿀벌의 진드기 방제용으로 사용되고 있다. 현재 우리나라에서는 농산물 살충제로 허가되어 있다. Coumaphos는 유기인계 살충제로 살충제 및 진드기 구충제로 이용되며, 국내에서 양봉용으로는 꿀벌의 응애 방제용으로 사용되고 있다. 현재 농산물의 살충제로 허가되어 있지 않으며 양봉용으로 “페리진액”, “페리진”이라는 상품명으로 2개가 허가되어 있다. Cymiazole은 진드기 구충제로 이용되며 양봉용으로는 꿀벌 진드기 방제용으로 사용되고 있다. 국내에서는 “바로킬”, “바로킬피”라는 제품명으로 2개 품목이 허가되어 있으며 “아피톨”이라는 cymiazole이 유효성분인 제품도 허가되어 있다. 이 동물성의약품들을 사용할수록 이들이 벌꿀에 잔류할 가능성은 높아진다.⁸

일반적으로 벌꿀에서 규제하는 양봉용 동물성의약품과 항생제에 대한 시험검사법은 추출, 정제, 검출로 이루어져 있다. 벌꿀은 점도가 높고, 다양한 성분들을 포함하는 혼합물이므로 원하는 특정 성분의 추출이 힘들기 때문에 신뢰할만한 결과를 얻기 위해서는 전처리가 필수적이다. 추출방법으로는 solvent extraction (SE), supercritical fluid extraction (SFE), solid-phase extraction (SPE), matrix solid-phase dispersion (MSPD)와 기구를 사용한 간편한 추출방법으로 solid-phase microextraction (SPME), stir bar sorptive extraction (SBSE)방법이 있다.^{4,9} 정제방법으로는 solid-phase extraction (SPE) cartridge 방법이 널리 사용되고 있는데, 동물성의약품의 정제는 ODS cartridge를 사용한 방법이 가장 일반적인 방법으로 사용되고 있다. 검출 방법으로는 보통 액체 크로마토그래피(liquid chromatography, LC) 방법을 많이 사용하고 있다. 이때, 화합물의 기능기 중심의 선택적 검출기인 형광검출기와 전기화학검출기도 널리 사용하고 있지만, 일반적으로 UV-Vis 검출기를 많이 사용하고 있다. 또한, 고감도의 측정방법인 LC/MS 방법으로 정량과 정성분석을 동시에 수행하고 있는 경우도 많으며,⁹ 이때의 이온화 방법으로는 electrospray (ESI)와 atmospheric pressure chemical ionization (APCI) 방법이 사용되고 있다.¹⁰ 동물성의약품의 또 다른 고감도 검출방법으로는 화합물의 기능기 중심의 선택적 검출기를 가진 GC 방법이 널리 사용되고 있고, 정량과 정성분석이 동시에 이루어지는 GC-MS 방법이 보편화되고 있다.¹¹ 최근에는 LC-MS/MS와 GC-MS/MS를 이용한 방법이 많이 보고되고 있다.¹²⁻¹⁴

본 연구에서는 국내에서 양봉용 동물성의약품에 대해 설정한 최대잔류허용기준을 참고로 하여 2011년 1월과 2월, 국내에서 시판된 벌꿀 10종을 대상으로 잔류가능성이 있는 동물성 의약품 4종-amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole-의 잔류 실태를 조사하였다.¹⁵ 이를 위해 여러 농도의 각 화학물질 표준용액들을 제조하고, 분석을 실시하여 검정곡선을 구한 후, 시판되는 10종의 벌꿀을 sampling한 시료들에 대해 HPLC 분석을 실시하여 그 속에 포함된 동물성 의약품의 정성분석과 정량분석을 실시하였다. 그리고 그 결과를 5년여 전에 HPLC-UV 방법으로 행한 분석결과¹⁵와 비교하여 국내에서 판매되는 벌꿀에 대한 안정성을 판단하는데 도움이 되고자 하였다.

2. 실험

2.1. 기기 및 시약

HPLC기기는 Waters사 (Milford, USA)의 Waters 996 photodiode array detector를 장착한 Waters 2690 Separation Module을 사용하였다. HPLC 전개용매는 J.T. Baker (Phillipsburg, USA)에서 구입한 HPLC급의 acetonitrile을 사용하였으며, H₂O는 3차 증류수를 사용하였고, column은 Waters사 (Milford, USA)에서 구입한 C-18 칼럼인 Sunfire (내경 4.6 mm, 길이 250 mm, 입자 크기 5 μm)을 사용하였다. 표준용액을 만드는데 사용한 amitraz와 bromopropylate, coumaphos는 CHEMICAL SERVICE (West Chester, USA)에서 구입한 순도 99%의 것을 사용하였고, cymiazole의 경우는 국내 제조사인 일진 에프 엔 비(Seoul, Korea)에서 제조한 “바로킬”로부터 cymiazole의 HCl 염 형태로 있는 것을 입수하여 1M NaOH로 추출한 후에 잔유물을 소량의 CH₂Cl₂에 녹여 실리카겔을 통과시켜 정제하였다. 정제된 화합물을 NMR, IR 등으로 cymiazole임을 확인하여 실험에 사용하였다. 벌꿀시료로부터 각 유기물을 추출 시 전체 수용액의 액성을 염기성으로 하기 위해 사용된 NH₄OH는 순도가 25%이며, Duksan Pure Chemical CO. (Ansan, Korea)에서 구입하였다. 추출이 끝난 후 농축된 시료를 묽히는데 사용한 아세톤과 헥산은 HPLC급 용매를 사용하였다. 또한, 내부 표준물로 ALDRICH SIGMA사 (St. Louis, USA)의 benzoin-methylether (순도 99%)를 사용했다. 추출한 용액을 건조시키기 위해 사용한 MgSO₄는 SHINHO PURE CHEMICALS CO. (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. 실험에 사용된 벌꿀 시료 10종은 모두 국내에서 시판되는

Table 2. Information of ten honeybee sample

Sample	Production Company	Purchased from	Purchasing Day	Kind of honey
Sample 1	Odduki (오뚜기)	HomePlus (홈플러스)	2011. 1. 25	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 2	Hasung (하성벌꿀)			Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 3	Hanrasan (한라산 식품)	Internet	2011. 2. 9	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 4	Kang-won (강원양봉)		2011. 2. 9	Apiculture-acacia (양봉 - 아카시아)
Sample 5	Kwang-dong (광동생활건강)		2011. 2. 9	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 6	Kuk-je (국제식품)		2011. 2. 15	Apiculture-acacia (양봉 - 아카시아)
Sample 7	Sin-lim (신림농업협동)		2011. 2. 15	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 8	Dong-seo (동서식품)		2011. 2. 15	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 9	Kyo-reo (고려자연식품)		2011. 2. 15	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)
Sample 10	U-seong (우성농산)		2011. 2. 15	Apiculture-mixed (양봉 - 잡화)

것으로 제조사와 구입처 등의 정보는 Table 2와 같다.

2.2. Amitraz(A), bromopropylate(B), coumaphos(C) 및 cymiazole(Cy) 100.0 ppm 저장용액(stock sol'n)의 제조

순수한 A, B, C, Cy 각각을 정확히 50.0 mg 씩 취하여 합친 갈색병에 내부 표준물질인 benzoimethylether가 1.0 ppm 포함된 2% acetone in hexane 용액 500.0 mL를 가하고 초음파를 10분간 가하면서 잘 녹인다.

2.3. Amitraz(A), bromopropylate(B), coumaphos(C) 및 cymiazole(Cy) 혼합 표준용액의 제조

앞서 제조한 amitraz (A), bromopropylate (B), coumaphos (C) 및 cymiazole (Cy)가 함께 들어있는 100.0 ppm 저장용액을 내부 표준물질인 benzoimethylether가 1.0 ppm 포함된 2% acetone in hexane 용액으로 희석하여 각각 25, 50, 100, 200, 1000 ppb 혼합 표준용액을 제조하였다.

2.4. 추출

추출은 식품의약품 안전청에서 고시한 추출방법을 따랐다.⁷ 벌꿀 5.00 g을 300 mL 삼각 플라스크에 정밀히 달아 물 70 mL와 암모니아수 10 μ L를 넣고, 5분간 균질화한 후, 추출용액 70 mL를 넣어 25분간 상

온에서 교반시킨다. 모든 용액을 300 mL 분액깔때기에 옮기고, 삼각 플라스크를 10 mL 추출용액으로 2회 헹구며, 헹군 용액을 분액 깔대기에 합친다. 분액 깔대기를 1분간 심하게 흔들어서 섞은 후 정치하여 물 층(하층부)을 다른 분액 깔대기에 옮긴다. 여기에 추출용액 30 mL를 넣어 분액 깔대기를 1분간 심하게 흔들어서 섞은 후 정치하여 분액 깔대기에 있는 물 층은 버리고, 유기층은 앞서 모은 유기 용매층이 들어 있는 분액 깔대기에 10 mL 추출용액으로 2회 헹군 용액을 합친다. 분액 깔대기에 세척용액 70 mL를 넣고, 심하게 흔들어서 섞은 후 정치하여 물 층은 버리고, 다시 세척용액 70 mL를 넣고 한번 더 반복한 후에 유기 용매층을 삼각플라스크에 옮긴다.

추출 중 벌꿀의 종류에 따라 슬러리가 생겨서 층 분리가 깨끗하게 안되는 경우에는 분액 깔대기에서 하부층에 있는 물을 최대한 버리고, 유기층을 슬러리가 빠져나오지 않게 분액 깔대기 위로 천천히 부으면서 삼각플라스크에 모은 후, 분액 깔대기에 추출용액을 추가로 30~40 mL 넣고, 심하게 흔들 후 유기층을 슬러리가 빠져나오지 않게 분액 깔대기 위로 천천히 부으면서 삼각플라스크에 모은다. 위 동작을 2회 더 실시하여 앞서 모은 유기층과 합친 후 여기에 적당량의 무수 황산마그네슘을 넣고, 약하게 흔들어서 섞은 후 5분간 방치하였다가 여과한다. 추출용액 10 mL로 삼

각플라스크를 씻고, 이 씻은 액으로 여지상의 잔류물을 씻는 조작을 2회 되풀이하며 여과한다. 여액을 합쳐 35 °C 이하의 수욕조에서 유기용매를 감압 하에 날려보낸다. 잔사를 내부표준물이 포함된 2% acetone in hexane 용액 2 mL에 녹여서 시험용액으로 사용한다.

2.4. HPLC 실험

안지름이 4.6 mm이고, 길이가 250 mm인 스텐레스관의 C18컬럼을 사용하였으며 column oven을 25 °C로 설정하여 HPLC 분석을 실시하였다. Amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole의 표준용액으로 동시 분석 시에는 이동상으로 70% acetonitrile in H₂O 용액을 사용하였고, 유속은 1.2 mL/min으로 하였다. 불순물이 많이 들어 있는 벌꿀 시료를 실험할 때도 같은 이동상으로 유속을 1.2 mL/min으로 실험하였다. 시료 주입량은 20 µL 주입했으며, 이 때 autosampler를 20 µL로 설정하여 주입량을 조절하였다. 동일한 시료들을 각각 4회씩을 분석하였고, 각 chromatogram의 피크 면적을 정규화된 내부표준물질의 피크 면적을 이용하여 표준화 하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

벌꿀 속에 잔류하는 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole에 대한 검정곡선을 작성하기

위하여 각 화합물의 예상 잔류 허용치를 100 ppb로 하고 그 농도 부근의 표준용액(25, 50, 100, 250, 1000 ppb)을 이용해 HPLC 분석을 실시하였다. 각 농도별로 4회씩 분석하여 각각에 대한 chromatogram을 얻었다. 이 때 예상 잔류허용치를 100 ppb로 한 이유는 조사 대상 물질 중 가장 독성이 강한 coumaphos에 대한 미국과 유럽연합에서 동물성의약품의 최대잔류허용기준을 근거로 하였다.¹⁶ Fig. 1에 순수한 각 물질 100 ppm을 내부 표준물이 포함된 용액에 녹여 분석한 크로마토그램을 나타내었고, 이를 통해 혼합용액에서 각 피크가 어떤 물질의 피크인지를 비교확인하였다.

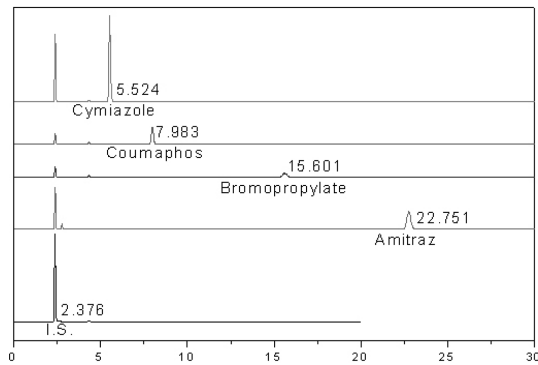


Fig. 1. Chromatograms of 100 ppm of each of amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole standard on C-18 column. Flow rate; 1.2 mL/min, detection; 254 nm. Eluents; 70% acetonitrile in H₂O.

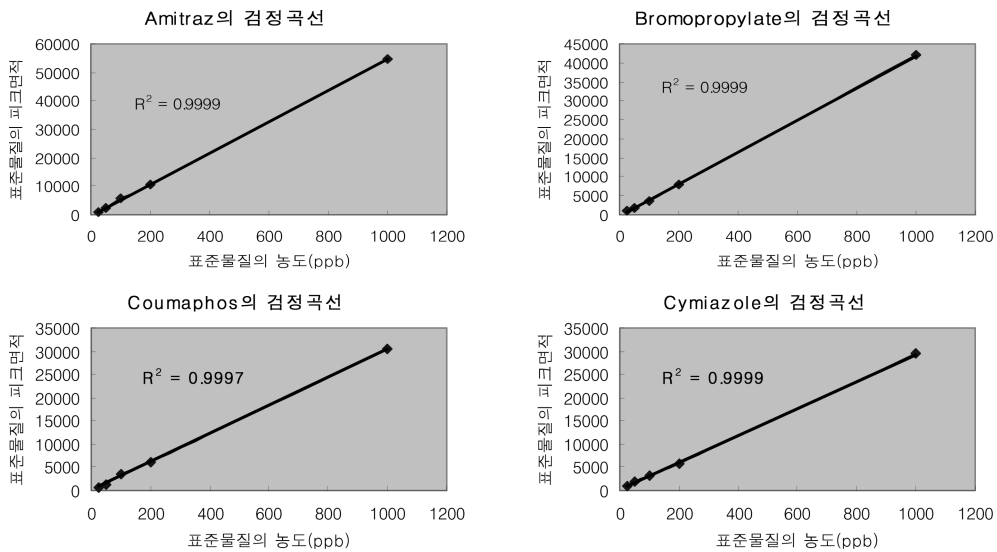


Fig. 2. Calibration graphs of amitraz, bromopropylate, coumaphos and cymiazole obtained with 25, 50, 100, 200, 1000 ppb standard solution.

Table 3. Linearity^a for four acaricides residues in honey

Compounds	Concentration (ppb)	R ² value
Amitraz	25, 50, 100, 200, 1000	0.9999
Bromopropylate	25, 50, 100, 200, 1000	0.9999
Coumaphos	25, 50, 100, 200, 1000	0.9997
Cymiazole	25, 50, 100, 200, 1000	0.9999

^alinearity : R² value.

실험결과 내부표준물(IS)은 2.38분 경에 나타났고, 분석시료들의 피이크와 중복되지 않은 위치에서 큰 피이크 크기를 보여 내부표준물로서 효과적으로 사용할 수 있었다. 각 chromatogram의 면적비의 평균을 토대로 분석대상 4개 물질의 검정곡선을 작성하여 Fig. 2에 나타내었다. 각 검정곡선에 대한 직선성은 Table 3에 따로 정리하였다.

Amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole 모두 직선성이 0.999이상으로 나타났으며, 검정곡선으로

사용하기에 적합하였다.

3.2. 벌꿀 시료 중 동물성의약품의 정성 및 정량 분석

벌꿀 속에 잔류하는 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole에 대한 정량분석을 위해 시판되는 시료 10종에 대해 내부 표준물이 포함된 유기용매로 추출을 실시하였고, 추출된 시료들을 HPLC로 정성분석을 실시하였다. 정성분석을 위해 먼저 내부표준물질이 포함된 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole 각각의 표준용액의 chromatogram을 찍어서 머무름 시간을 확인하였다.

또한 이미 확보된 amitraz, bromopropylate, coumaphos, 그리고 cymiazole의 머무름 시간에 나타나는 피이크의 UV-Vis 스펙트럼 상의 최대흡광도를 조사하여 Fig. 3에 나타내었다. 정량분석을 하는 중에 벌꿀시료의 chromatogram에서 조사대상 4개의 화합물과 동일

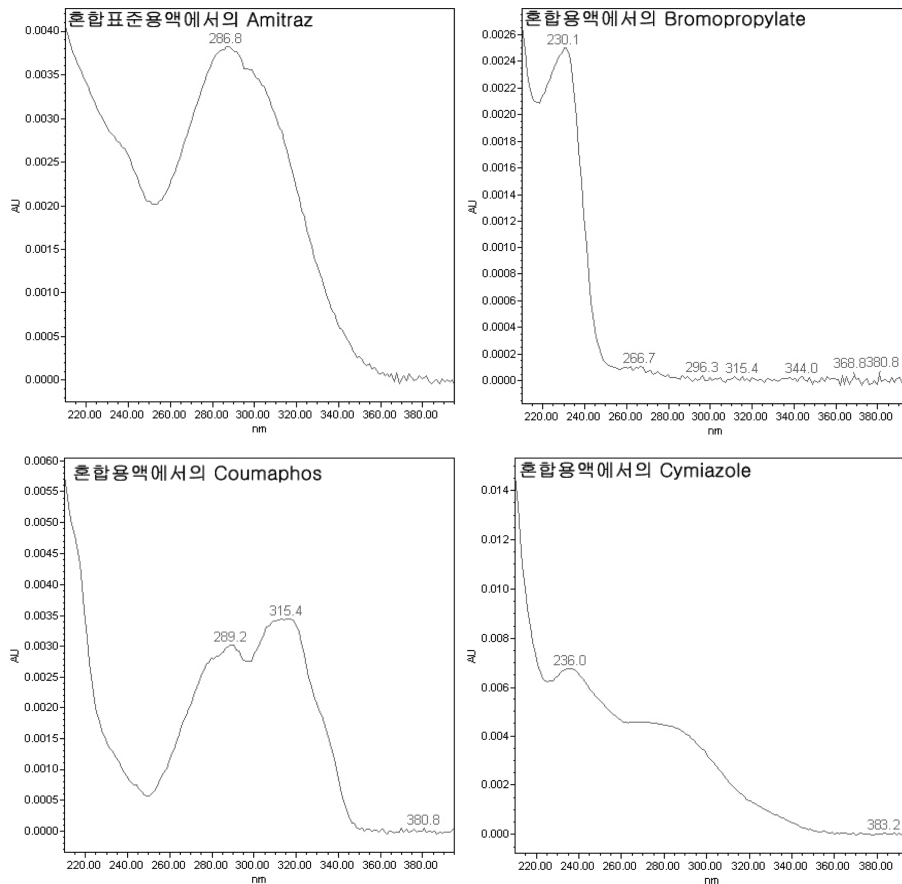


Fig. 3. λ_{\max} of 1000 ppb amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole standard mixtures.

한 머무름 시간의 피이크가 발견되면 최대흡광도가 같은지를 통해 동일 물질 여부를 확인할 수 있도록 하였다.

과장별로 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole이 혼합된 25 ppb, 50 ppb, 100 ppb, 200 ppb, 1000 ppb의 표준용액의 chromatogram을 비교하였으며, 혼합용액 속에서 각각의 물질이 단독으로 존재할 때와 동일한 머무름 시간을 가지는지 또한 그 피이크의 최대흡광도가 동일한지를 확인하였다. 과장별로 혼합 표준용액의 크로마토그램을 비교했을 때 233 nm에서 bromopropylate와 cymiazole의 피이크가 가장 크게 나타났고, 289 nm에서는 amitraz가, 313 nm에서는 coumaphos가 가장 큰 피이크를 보였다. 따라서 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole를 분석하기 위해서는 233 nm, 289 nm, 313 nm에서 나타나는 각각 시료들의 크로마토그램을 확인하는 것이 효과적임을 알 수 있었다.

혼합표준용액에서 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole 각각에 해당하는 피이크의 최대흡광도는 각 물질이 단독으로 존재했을 때와 동일하게 나타났으며, 이는 여러 물질이 포함된 벌꿀 시료를 정성분석 할 때 동일 물질 여부를 판단하기 위해 유용하게 이용될 수 있다. 즉, 시료에서 amitraz, bromopropylate, coumaphos, 그리고 cymiazole의 머무름 시간과 동일한 시간에 나타나는 피이크가 발견되면 그 피이크의 최대흡광도를 4가지 성분의 최대흡광도와 비교하여 동일 물질 여부를 확인하는데 이용하였다.

이 후 발견된 물질에 대해서는 정량분석을 위해 내부표준물질로 normalization 후 검정곡선을 통하여 해

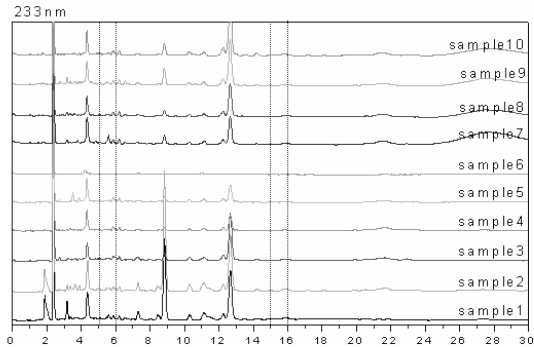


Fig. 4. Chromatograms of ten honeybee samples on C-18 column. Injection volume; 20 μ L. Flow rate : 1.2 mL/min, detection: UV; 233 nm. Eluents; 70% acetonitrile in H₂O.

당물질의 정량을 계획하였다. 10개의 실제 시료를 233 nm, 289 nm, 313 nm에서 과장별로 분석하였고, 233nm에서 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Fig. 4에서 볼 수 있듯이 몇몇 시료들에서 5~6분 사이에 cymiazole로 의심되는 피이크가 발견되었으나 15~16분 사이에서 bromopropylate로 의심되는 피이크는 발견되지 않았다. Amitraz를 확인하기 위해 10개의 시료들에 대해 289 nm에서 분석한 결과, 21~24분 사이에서 amitraz로 의심되는 피이크를 UV-Vis 스펙트럼의 최대흡광파장(max) 비교를 통해 확인하였고, 시료 중에 amitraz가 없음을 확인하였다. Coumaphos를 확인하기 위해 313 nm에서의 크로마토그램을 관찰하였더니 의심되는 피이크가 발견되지 않았다. Fig. 4에서 5.5분대 부근에 cymiazole로 의심되는 피이크들을 확인하기 위해 시료의 크로마토그램의 스케일을 확대

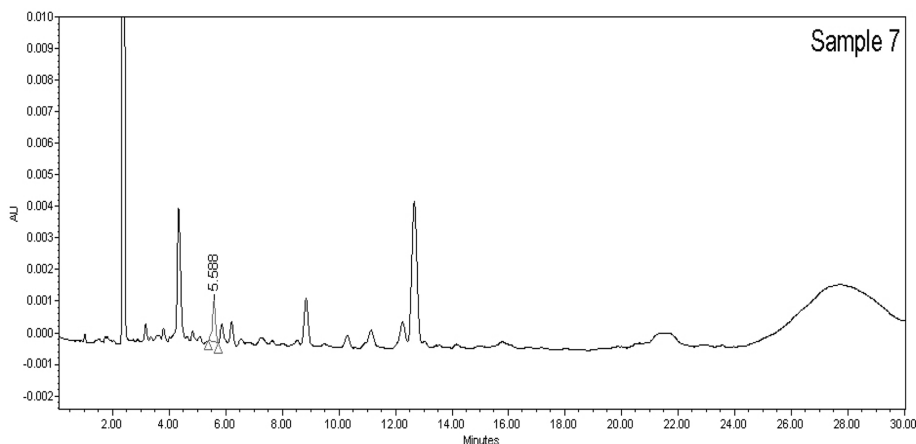


Fig. 5. Chromatogram of sample 7 on C-18 column. Flow rate : 1.2 mL/min, detection: UV; 233 nm. Eluents; 70% acetonitrile in H₂O.

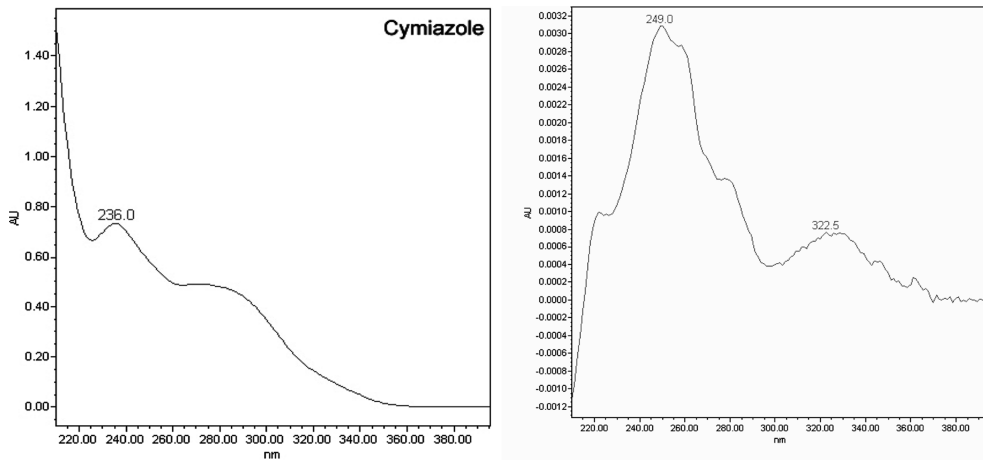


Fig. 6. λ_{\max} of (a) 100 ppm cymiazole standard and (b) a compound appeared on 5.588 min in Fig. 5.

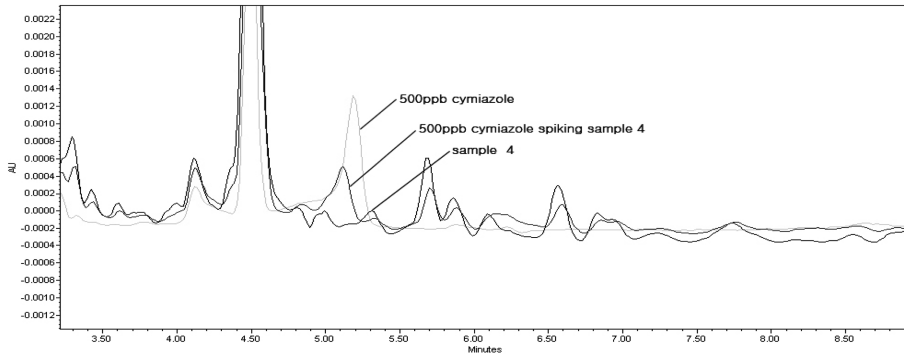


Fig. 7. Chromatograms of sample 4 and related samples. Flow rate : 1.2 mL/min, Eluents; 70% acetonitrile in H₂O.

하였으며(Fig. 5) cymiazole로 의심되는 피이크들의 최대흡광도를 조사한 다음 순수한 cymiazole의 최대흡광도와 비교하였다(Fig. 6).

Fig. 6에서 볼 수 있듯이 5.588 min에 cymiazole로 의심되는 피이크의 최대흡광도를 조사하여 순수한 cymiazole의 최대흡광도와 비교하였더니 서로 다른 패턴으로 나타났으며 이 성분은 cymiazole이 아닌 것으로 판별되었다.

Cymiazole로 의심되는 피이크들을 좀 더 정확히 판별하기 위해 해당 시료에 spiking 실험을 추가로 실시하였다. 순수한 cymiazole 500 ppb 표준 용액을 시료 용액과 1:1로 섞어서 이것을 주입하여 의심되는 피이크의 변화를 살펴보았다. 표준 용액의 농도가 너무 진하면 다른 피이크와 섞여 구별하기 힘들고 농도가 너무 묽으면 피이크의 변화를 관찰하기 힘들기 때문에 500 ppb의 농도로 실험하였다. Fig. 7에 sample 4에 대해서 500 ppb cymiazole 표준 용액의 데이터와 500

ppb cymiazole 표준 용액과 시료를 혼합한 데이터, 그리고 시료의 데이터 3가지를 비교하여 농도 분석을 실시한 예를 나타내었다.

Fig. 7에서 볼 수 있듯이 sample 4를 spiking 실험한 결과 5.35분의 피이크는 면적이 줄어들었기 때문에 cymiazole로 볼 수 없었다. 따라서 특정 피이크의 UV-Vis 스펙트럼 상의 최대흡광도를 비교하여 얻은 정성 분석의 결과는 신뢰할 수 있다고 판단되었다. 앞에서의 방법으로 분석한 모든 벌꿀 시료들의 정성 분석 결과들을 Table 4에 정리하였다.

분석한 10종의 벌꿀 시료 모두 cymiazole과 비슷한 머무를 시간을 가지는 피이크가 발견되었다. 좀 더 정확한 확인을 위해 해당 피이크들의 최대흡광도를 조사하였으나 순수한 cymiazole의 최대흡광도와 일치하는 피이크는 관찰되지 않았다. Cymiazole 이외에 amitraz, bromopropylate, coumaphos도 25 ppb 이상의 농도 범위에서는 발견되지 않았으나 Fig. 4의 크로마

Table 4. Amount of amitraz, bromopropylate, coumaphos, and cymiazole in honey^a

Name	A	B	C	Cy	Kind of honey ^b
Sample1	ND	ND	ND	ND	M
Sample2	ND	ND	ND	ND	M
Sample3	ND	ND	ND	ND	M
Sample4	ND	ND	ND	ND	A
Sample5	ND	ND	ND	ND	M
Sample6	ND	ND	ND	ND	A
Sample7	ND	ND	ND	ND	M
Sample8	ND	ND	ND	ND	M
Sample9	ND	ND	ND	ND	M
Sample10	ND	ND	ND	ND	A

^aAnalysis condition: C18 column, 30%(v/v) water in acetonitrile. A: amitraz, B: bromopropylate, C: coumaphos, C: cymiazole. ND: non detected. ^bKind of honey; mixed(M), Acacia(A).

토그램에서 볼 수 있듯이 이들 화학종 이외의 잡다한 불순물 피이크들이 적지 않게 나타나는 것으로 볼 때 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole 이외에 다른 유기 화합물들이 벌꿀 속에 적지 않게 포함된 것으로 생각된다.

이들 결과를 5년 전에 분석한 결과와 비교하였을 때 분석 대상 물질인 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole의 경우는 5년 전과 유사하게 잘 관리되고 있음을 알 수 있었으나 Fig. 4를 비롯한 모든 벌꿀 시료관련 크로마토그램에서 볼 수 있듯이 벌꿀 속에 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole이 아닌 유기 화합물들이 포함되어 있어서 이들에 대한 정성분석과 정량분석이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

4. 결 론

현재도 많은 양봉 농가에서 꿀벌의 질병 방지를 위해 항생제와 살충제와 같은 다양한 유해 물질들을 사용하고 있다. 벌꿀 속에 동물성 의약품의 잔류 여부를 조사하기 위해 최근 생산된 벌꿀 10종에 대해 양봉용 동물성 의약품 4종-amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole-의 잔류 여부를 조사하였다. 먼저, 벌꿀 속의 동물성 의약품을 추출하기 위해 5.00 g의 벌꿀 시료를 취하여 0.25% NH₄OH가 포함된 증류수와 2% acetone/hexane 용액을 이용하였다. 추출된 시료를 HPLC-DAD방법으로 조사하였다. 이 때, 이동상으로 30% H₂O in ACN을 이용하였고, 내부 표준물질로는 benzoimethylether를 사용하였다. 4종의 동물성 의약품

의 표준용액으로 검정곡선을 만든 결과, 각각의 검정곡선은 직선성이 0.999이상으로 분석물질의 농도를 결정하는데 적합하였다. 실제 벌꿀 시료의 분석 시 4종의 동물성 의약품은 30분 이내에 잘 분리되었다.

벌꿀 시료 10개에 대한 HPLC 분석 결과 amitraz, bromopropylate, coumaphos로 의심되는 피이크는 발견되지 않았다. 그러나 cymiazole로 의심되는 피이크는 10종의 벌꿀에서 발견되었다. 10종의 벌꿀에서 cymiazole로 의심되는 피이크들에 대해 최대흡광도와 spiking 실험을 실시하여 확인하였다. 그 결과 10종의 벌꿀에서 5-6분 사이에 나타나는 피이크 모두 cymiazole과 다른 물질임을 확인하였다.

결론적으로 본 연구에서 조사한 10종의 벌꿀에서는 살충제로 사용되는 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole의 성분이 25 ppb 이상으로는 검출되지 않았다. 시료수가 적기 때문에 본 연구의 결과로부터 시판되는 벌꿀 속에 동물성 의약품의 포함유무를 단언하기는 쉽지 않지만 무작위로 선택한 벌꿀시료에서 amitraz, bromopropylate, coumaphos, cymiazole의 성분이 25 ppm 이상 발견되지 않은 것은 나름 가치가 있는 결과로 생각된다. 그러나 각 벌꿀 시료의 크로마토그램에서 볼 수 있듯이 관심을 가졌던 동물성의약품 피이크 이외의 다른 유기화합물들이 우리가 먹는 벌꿀 속에 적잖게 포함되어 있음을 확인할 수 있었으므로 차후에는 이들에 대한 정성 및 정량 분석이 요구된다.

감사의 글

이 논문은 2012학년도 경북대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

참고문헌

1. H. Boncristiani, R. Underwood, R. Schwarz, J. D. Evans, J. Pettis, D. vanEngelsdorp, *J. Insect Physiol.*, **58**, 613-620 (2012).
2. S. R. Rissato, M. S. Galhiane, F. R. N. Knoll, B. M. Apon, *J. Chromatogr. A*, **1048**, 153-159 (2004).
3. M. Fernandez, Y. Pico and J. Mans, *J. Food Protection*, **65**, 1502-1511 (2002).
4. Council regulation EC No. 1478/2001 OJ L 195 (July 19, 2001, p.32).
5. Food and Drug Administration of the United States.

- Pesticides tolerances (<http://www.cfsan.fda.gov>).
6. R. Rial-Otero, E. M. Gaspar, I. Moura and J. L. Capelo, *Talanta*, **71**, 503-514 (2007).
 7. Notice No. 2007-68 (October 18, 2007), Korea food and drug administration(<http://www.kfda.go.kr>). p17, p82 (2007).
 8. E. Korta, A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo and F. Vicente, *J. Chromatogr. A*, **930**, 21-29 (2001).
 9. M. Volante, R. Galarini, V. Miano, M. Cattaneo, I. Pecorelli, M. Bianchi, M. T. Marinoni, L. Cossignani and P. Damiani, *Chromatographia*, **54**, 241-246 (2001).
 10. M. Fernandez, Y. Pico, S. Girotti and J. Mans, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3540-3547 (2001).
 11. B. Albero, C. S. Brunete, J. L. Tadeo, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 5828-5835 (2004).
 12. S. Robert, P. Brian, T. Stefan and R. Daniel, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 3509-3516 (2008).
 13. K. Alaa, *J. Agric. Food Chem.*, **58**, 5926-5931 (2010).
 14. D. Sawsan and O. G. Fazil, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 5775-5780 (2008).
 15. J. J. Ryoo, S. H. Kim, Y. H. Jeong, H-S. Do, J. E. Ryu, H. Y. Kwon, J. Y. Jeong, H. J. Park, S. H. Lee and M. K. Hong, *J. Hong, Bull. Kor. Chem. Soc.*, **29**, 1043-1047 (2008).
 16. R. Brimecombe, J. Limson, *Talanta*, **71**, 1298-1303 (2007).