농약과학회지 제16권 제4호 (2012)
Vol. 16, No. 4, pp. 350-356 (2012)
Open Access http://dx.doi.org/10.7585/kjps.2012.16.4.350
Online ISSN 2287-2051
Print ISSN 1226-6183
ORIGINAL ARTICLES / RESIDUE

농약 이화학시험 분석기관의 숙련도시험을 통한 정도관리체계 확립 연구

장희라* · 박효경 · 임영주[2] · 김광호[2] · 김찬섭[1] · 김 균
호서대학교 대학원 바이오응용독성학과 및 안전성평가센터,
[1]농업과학기술원 농산물안전성부, [2]농촌진흥청 농자재산업과

(Received on November 21, 2012. Revised on December 3, 2012. Accepted on December 15, 2012)

Establishment of National Quality Control System for Analytical Laboratory of Pesticide Products by Proficiency Testing

Hee-Ra Chang, Hyo-Kyung Park, Youngjoo Lim[2], Kwang-Ho Kim[2], Chan Sub Kim[1] and Kyun Kim

Environmental Chemistry, Department of Applied Biotoxicology, Graduate School of Hoseo University, Hoseo Toxicology Research Center, 165 Sechul, Baebang, Asan-city, Chungnam 336-795, Korea
[1]Department of Crop Life Safety, National Academy of Agricultural Science, Suwon 441-707, Korea
[2]Agro-materials Industry Division, Rural Development Administration, Suwon 441-707, Korea

Abstract Performance of proficiency testing and the validation of analytical method was included a scheme of quality assurance in analytical chemistry laboratory to monitor a laboratory's performance abilities and produce consistently reliable data. This study was assessed the applicability of proficiency testing scheme proposed for analytical laboratories of pesticide product in domestic. The validation of analytical methods, stability and homogeneity for formulated pesticide products (emulsifiable concentrate) of emamectin benzoate and lufenuron was confirmed for the proficiency testing. The z-score of 33 participation laboratories for emamectin benzoate were that the numbers of outlier were 2 laboratories (6.0%), z-score outside the range from −3 to 3 designated "unaccptable" were 2 laboratories and z-score in the ranges −2 to −3 and 2 to 3 designated "questionable" were 3 laboratories (9.0%). Three laboratories (9.0%) showed the z-score designated "questionable" for lufenuron. The additional proficiency testing for various product types will be needed to establish the scheme of quality control.

Key words Homogenity, Pesticide formulation, Proficiency test, Stability

서 론

최근 국내에서도 분석시험기관의 시험결과 신뢰성 확보에 대한 중요성이 확대되면서 국제적인 기준에 적합한 검증절차의 필요성이 요구되어 국내 인증기관의 정도관리를 위한 노력의 일환으로 시험과정 및 결과에 대한 신뢰성을 높이고자 농약 이화학시험 분석기관의 농약제품 분석법의 검증절차를 포함한 정도관리 체계를 제안하는 연구가 수행되고 있다(Chang et al., 2012). AOAC(Association of Official Analytical Chemists), ISO(International Organization for Standard) 및 IUPAC(International Union of Pure and Applied Chemistry) 등의 국제기관들은 분석능력평가의 일환으로 숙련도시험 수행에 관한 통합지침서를 제시하고 있으며, 국내 환경부는 정기적으로 숙련도 시험을 수행하여 관련 분석기관의 분석능력을 평가하고 있다(Thompson et al., 2006; 국립환경과학원, 2009; ISO/IEC, 2010). 숙련도 시험은 시험기관간 비교시험을 통하여 시험수행 및 기술력 파악 및 기관인증을 위한 요구 조건이나, 시험결과의 정확성여부

*Corresponding author
Tel: +82-41-540-9696, Fax: +82-41-540-9867
E-mail: hrchang@hoseo.edu

를 인지하여 개선하기 위한 시험기관내 내부관리시스템(self-help system)으로 시험자간 시험수행 능력 평가 자료로 활용가능하다. 숙련도 시험과 관련하여 IUPAC에서 ISO 및 AOAC 등이 공동으로 숙련도시험 수행에 필수적인 항목을 기술하고 있고, CIPAC(Collaborative in International Pesticides Analytical Council) 및 IUPAC 등에서는 농약제품 분석시 각각의 분석기관에서 적용한 분석법에 대한 분석검증 절차를 위한 필수 항목으로 특이성, 선택성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 요구하고 있으며 이에 대한 적합성 판정기준을 제시하고 있다. 분석수행능력 평가는 z-score에 근거하여 기준값에 대한 정확성 및 비교 시험기관들의 결과값 분산정도를 바탕으로 적합성 범위를 평가하고 있어 이들 지침서를 근거로 하여 제안된 국내 농약이화학분석기관 숙련도시험 및 분석법 검증절차에 대한 지침서(안)이 제안되었다(Chang et al., 2011).

본 연구에서는 국내 농약이화학시험 분석기관의 수행능력 평가를 위한 숙련도 시험을 농약제품에 대한 분석법 검증 절차를 거쳐 안정성 및 균질성을 확보한 미지시료를 배포하여 실시하였으며, 숙련도시험에 참여한 분석기관으로부터 제출된 해당제품에 대한 결과값을 적절한 통계적 방법에 따라 평가하여 제안된 숙련도시험 지침서(안)의 국내 농약 이화학시험 분석기관의 적용가능성을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

시험약제 및 시약

숙련도 시험을 위한 대상 농약 및 제품을 선정하기 위하여 용도별 및 제형별 농약 생산 및 출하량 등을 2009년도 농약연보 자료를 검토한 결과, 용도는 생산량의 25% 및 출하량의 30% 이상을 차지하는 원예용 살충제로 선정하였으며, 제형은 45% 이상인 유제로 선정하였다(Fig. 1, Table 1).

대상농약 2종은 원예용 살충제 중 유제에서 생산 및 출하액에서 상위권을 차지하고 있는 emamectin benzoate와 lufenuron을 선정하였다. 숙련도 시험을 위한 시험약제는 emamectin benzoate 2.15% 유제(에이팜, 신젠타), lufenuron 5% 유제(파밤탄, 영일케미칼)를 사용하였다. 분석법 검증을 위한 표준물질은 emamectin benzoate(99.4%), lufenuron(99.7%) 분석용 표준품을 Sigma-Aldrich에서 구입하여 사용하였고, 숙련도시험을 위한 표준물질은 emamectin benzoate(90%, Qingdao KYX Chemical), lufenuron(99.7%, Jiangsu Flag Chemical)은 국립농업과학원에서 분양받아 배포하였다. 내부표준물질인 diallyl phthalate(DAP, %), di-n-amyl phthalate (DNAP, %) 및 기타 시약은 분석등급 이상을 사용하였으며, methanol, acetoniltrile 등의 유기용매는 HPLC 등급으로 Merck에서 구입하여 사용하였다.

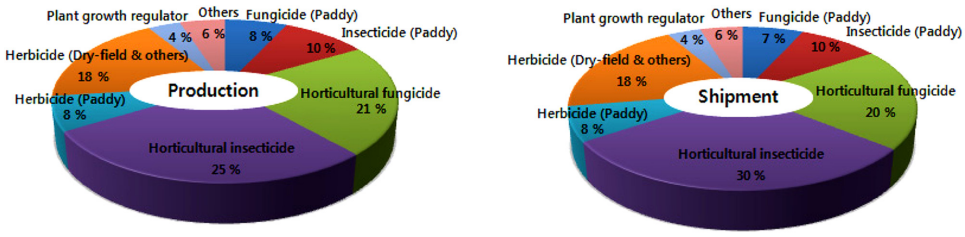

Fig. 1. Percentages of pesticide production and shipment by use classification in domestic.

Table 1. Percentages of pesticide production by formulation type in domestic

Formulation type	Emulsifiable concentrate	Wettable powder	Granule	Dustable powder	Water soluble powder	Others
Production(%)	46.3	32.6	17.5	0.8	0.7	2.0

Table 2. HPLC analysis conditions of emamectin benzoate and lufenuron

Pesticide	Emamectin benzoate	Lufenuron
Instrument	Agilent 1200 series	
Detector	Diode Array Detector(DAD)	
Column	Phenomenex Luna 250 × 4.6 mm, 5 μm	
Column temp.	40°C	
Mobile phase	Acetonitrile: 0.1% Phosphoric acid in water(55:45, v/v)	Acetonitrile: Water(90:10, v/v)
Wavelength	245 nm	250 nm
Flow rate	1.2 mL/min	1 mL/min
Injection volume	5 μL	10 μL

기기분석 조건

시험약제 2종에 대한 분석법 검증 및 숙련도시험 수행을 위한 기기분석은 Agilent 1200 series HPLC-DAD로 수행하였다(Table 2).

분석법 검증

농약 이화학시험 분석법 검증 절차(안)에 따른 분석법 검증을 통하여 시험농약 2종에 대한 특이성, 선택성, 직선성, 정밀성 및 정확성 확인 시험을 수행하였다. 분석법 검증을 위한 emamectin benzoate 및 lufenuron 저장표준용액은 각각 1,000 mg/L 및 2,000 mg/L 농도로 methanol에 용해시킨 내부표준물질 0.045% DAP 및 0.38% DNAP 용액을 이용하여 조제하였다. 특이성 및 선택성시험은 저장표준용액을 각각의 내부표준물질 용액으로 희석하여 조제한 emamectin benzoate는 750 mg/L, lufenuron은 300 mg/L 표준용액과 농약공정분석법과 동일하게 주성분 함량을 기준으로 조제한 emamectin benzoate 750 mg/L, lufenuron 333 mg/L 제품시료 용액의 기기분석 크로마토그램의 signal 및 spectrum을 확인하였다. 표준검량선의 직선성은 각각의 저장표준용액을 단계별로 희석하여 농약공정분석법상의 제품시료 중 분석물질 이론농도의 ±20% 범위로 emamectin benzoate 표준용액은 650, 700, 750, 800, 850 mg/L 농도로, lufenuron은 200, 250, 300, 350, 400 mg/L 농도로 조제한 후 기기분석 크로마토그램의 분석물질과 내부표준물질의 피크 면적비를 기준으로 표준검량선을 작성하여 확인하였다. 분석법의 정밀성 및 정확성은 숙련도시험을 위하여 emamectin benzoate 0.53% 및 lufenuron 2% 함량으로 제품시료를 조제한 후 5반복으로 채취하여 기기분석을 수행하였으며, 정밀성은 분석결과로부터 %상대표준편차(relative standard deviation, RSD)를 산출한 후 아래와 같은 Horwitz equation에 적용하여 산출된 허용값 이내임을 확인하였고, 정확성은 평균 회수율 및 95% 신뢰구간을 산출하여 확인하였다(Thompson et al., 2004; CIPAC, 2011).

$$\text{Horwitz equation} = 2^{(1-0.5\log C)} \times 0.67 \quad (1)$$

C: 소수로 표현한 분석물질의 시료 중 농도

안정성 및 균질성

숙련도시험을 위한 시료는 emamectin benzoate 2.15% 유제 및 lufenuron 5% 유제를 methanol로 각각 0.53% 및 2.0%로 희석하여 조제한 후, 농약공정 분석법에 따라 주성분을 기준으로 분석용 시료용액을 조제하였다. 제품시료의 안정성은 실온에서 시료 조제 직후 0일차 시료(Control) 및 조제 후 14일이 경과한 시료(Experimental)를 5반복으로 시험을 수행하였다. 안정성은 시험결과로부터 초기농도와의 차이(식 2)가 오차범위 10% 기준값($0.1\delta_p$, 식 3) 이내인 것을 확인하여 평가하였다.

$$Difference = Control\bar{x} - Experimental\bar{x} \quad (2)$$

$$\sigma_p = 0.1c \quad (3)$$

$\bar{x}$ = mean

σ_p = the standard deviation at 10% RSD

c = the mean of total data

균질성은 숙련도시험을 위하여 조제한 시료를 5반복으로 채취한 각각의 시료를 2반복으로 시험을 수행하여 총 10개의 시험결과로부터 우선 Cochran's test를 수행하여 이상치(outlier)를 확인한 후 F-검정에 의한 분석시료들의 허용편차 기준값을 산출하고 시료들의 분석결과 편차가 기준값 이내인 것을 확인하였다(Thompson, 2000; Thompson et al., 2006, IAEA, 2009).

숙련도시험

안정성 및 균질성이 확보된 emaectin benzoate 0.53% 및 lufenuron 2.0% 유제 제품시료에 대한 숙련도 시험은 농약 이화학시험기관으로 등록된 기관 중 40개 기관에 시료를 배포하여 33개 기관이 참여하였다. 숙련도시험에 의한 각 기관의 수행능력 평가는 참여기관에서 제출한 결과보고서를 근거로 하여 아래의 식에 따라 개별 참여기관의 평균 결과값(X), 기준이 되는 설정값(X_a) 및 목표표준편차(δ_p)를 이용하여 전환된 Z값을 평가기준에 따라 적용하였다(Table 3, Thompson, 2000).

$$\delta_p = \frac{0.02c^{0.8495}}{mr} \quad (4)$$

δ_p = standard deviation for proficiency assessment

c = concentration of the assigned value, expressed as a dimensionless mass ratio

mr = dimensionless mass ratio

$$Z = \frac{X - X_a}{\delta_p} \quad (5)$$

X = the participant's reported result

X_a = the assigned value

δ_p = the standard deviation for proficiency assessment

Table 3. Interpretation of Z-score for proficiency testing

Z-score range	Assessment
$Z = 0$	Perfect
$-2.0 \le Z \le 2.0$	Satisfactory or acceptable
$-3.0 < Z < -2.0$, $2.0 < Z < 3.0$	Questionable
$Z \le 3.0, Z \ge 3.0$	Unsatisfactory or unacceptable

결과 및 고찰

분석법 검증

특이성 및 선택성은 시험약제의 표준용액 및 제품시료에 대한 HPLC 분석 chromatogram상의 signal 및 spectrum으로부터 검출된 signal이 시험약제의 분석물질인 것을 확인하였으며, 제품시료의 불순물 등의 간섭물질로부터 시험약제의 분석물질이 선택적으로 분리되는 것을 확인하였다(Fig. 2, 3).

정량분석을 위한 표준검량성의 직선성은 분석물질의 이론농도의 ±20%내에서 표준용액 5개 농도를 선정하여 각 농도별로 2반복으로 분석한 결과, emamectin benzoate 및 lufenuron에 대한 표준검량선의 회귀 방정식은 각각 $Y = 1.3955x + 0.0802(R = 0.9952)$, $Y = 1.2269x - 0.0555(R = 0.9994)$였으며, 이때 상관계수(R)가 0.99이상으로 직선성이 양호하였다.

정밀성은 제품시료의 기기분석 결과값에 대한 %상대표준편차를 도출한 후 시료 내 분석 물질의 농도를 Horwitz equation에 적용하여 산출된 허용범위와 비교한 결과, emamectin benzoate의 표준용액 및 시료의 %상대표준편차는 각각 1.17, 0.89%로 Horwitz equation에 의한 기준인 1.34, 2.95 이내였으며, lufenuron의 표준용액 및 시료의 %상대표준편차는 각각 0.01, 1.62로 허용범위인 1.34, 2.41 이내로 분석법에 대한 재현성을 확인하였다(Table 4).

정확성은 적용 분석법에서 측정값이 이론값인 참값에 근접한 정도를 평가하기 위하여 측정값의 평균 및 표준편차를 이용한 95% 신뢰구간을 산출하였으며, emamectin benzoate 및 lufenuron에 대한 평균%회수율은 각각 102.9% 및

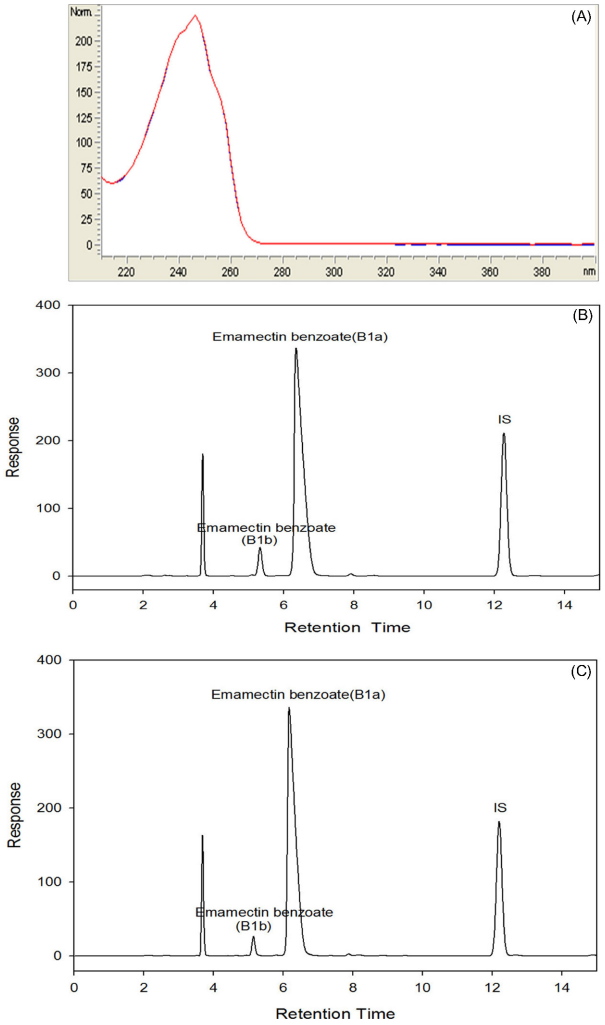

Fig. 2. Typical spectrum (A) and chromatograms of emamectin benzoate in standard solution at 750 mg/L (B) and formulation at 0.53% (C) sample.

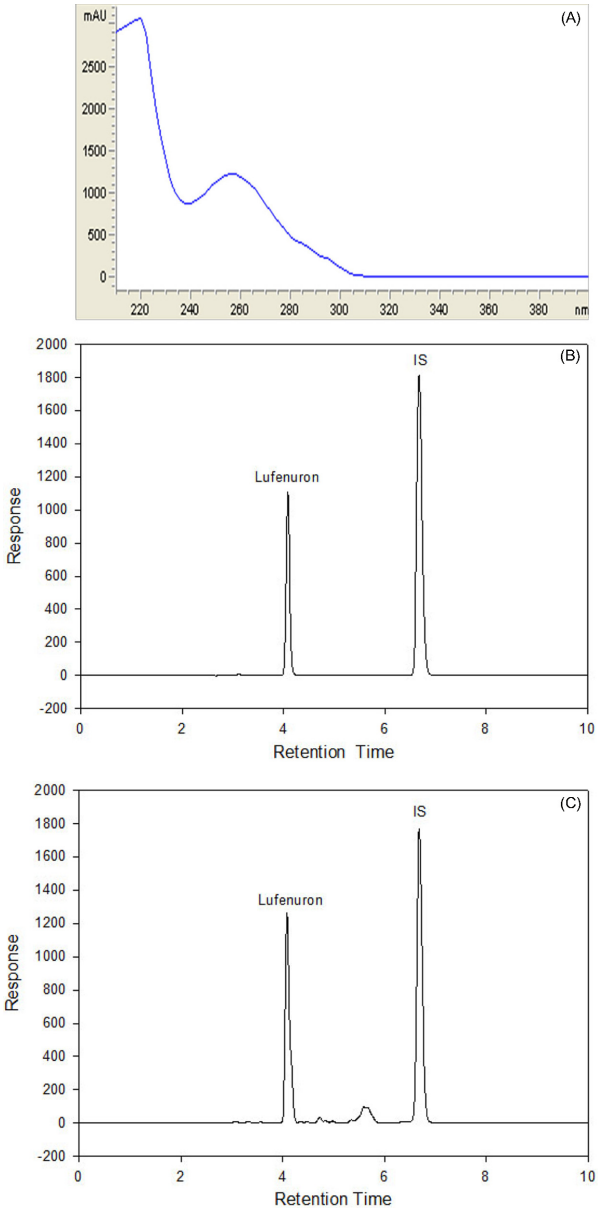

Fig. 3. Typical spectrum (A) and chromatograms of lufenuron in standard solution at 300 mg/L (B) and formulation at 2.0% (C).

Table 4. Estimation of precision for formulation of emamectin benzoate and lufenuron

Pesticides	A.I.(%)	Mean ± SD[a)]	%RSD[b)]	Acceptability[c)]
Emamectin benzoate	0.55	0.55 ± 0.01	0.89	2.95
	0.55			
	0.54			
	0.54			
	0.54			
Lufenuron	1.96	1.95 ± 0.01	1.62	2.41
	1.95			
	1.95			
	1.95			
	1.95			

[a)]Standard deviation.
[b)]Relative standard deviation.
[c)]This value is calculated by Horwitz equation.

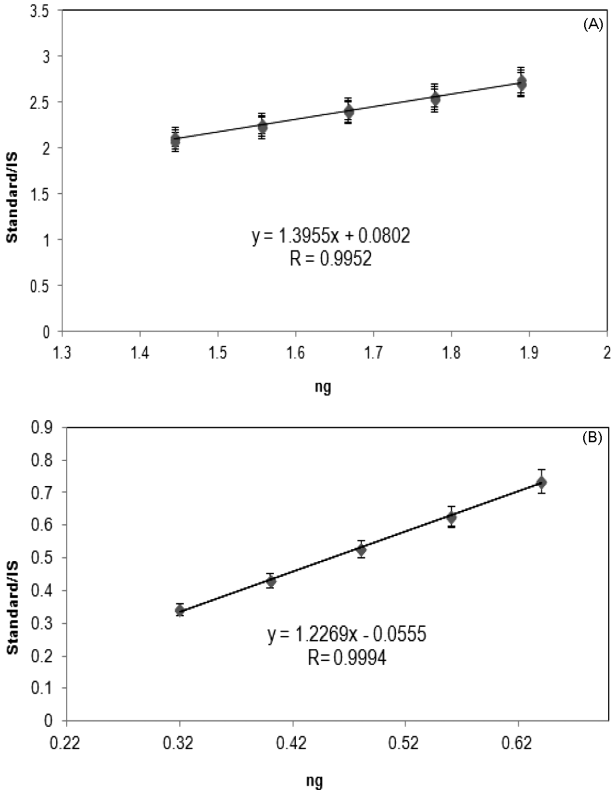

Fig. 4. Calibration curves of emamectin benzoate (A) and lufenuron (B).

97.7%로 주성분 함량이 1% 미만 시료의 허용기준인 95~105% 이내였다(Table 5).

안정성 및 균질성시험

숙련도 시험을 위하여 시험약제의 제품시료에 대한 실온에서의 14일 안정성시험을 수행한 결과, emamectin benzoate 및 lufenuron 시료 조제직후인 0일과 14일 후 분석측정값의 차이가 각각 0.002 및 0.007로 오차 10%이내 범위의 기준값($0.1\delta_p$)인 0.005 및 0.021보다 적은 값으로 14일 실온안정성을 확인하였다(Table 6).

숙련도시험 배포시료의 균질성은 각각의 농약제품에서 무작위로 채취한 emamectin benzoate 및 lufenuron 시료의 분석결과에 대한 Cochran's test를 수행하여 산출된 값은 각각 0.39 및 0.66이었으며, 95% 신뢰수준의 기준값인 0.84 이내로 이상치가 없음을 확인한 후, emamectin benzoate 및 lufenuron 시료의 분석결과 편차에 의하여 산출된 값은 각각 –0.000003 및 0.000025로, F-검정에 의하여 산출된 허용 기준값인 0.000173 및 0.001237 이내로 숙련도시험 배포시료가 충분히 균질한 것을 확인하였다(Table 7).

숙련도시험

농약 이화학시험 기관의 수행능력 평가체계 확립을 위한 사례연구(case study)로 농촌진흥청의 협조로 숙련도시험을 수행하였다. 숙련도시험에 참여한 33개 기관의 분석 결과는 우선 Grubbs test에 의하여 95% 신뢰구간에서 이상값을 확인한 후 z값 산출시 제외시켰다. 참여기관의 수행능력 평가를 위한 z값은 전체 참여기관의 측정 평균값을 기준이 되는 설정값으로 선정하고, Horwitz equation을 적용하여 산출된 목표표준편차를 기준으로 설정하여 각각의 참여기관에서 제출한 평균 결과값으로부터 산출하였다(IAEA, 2009; Thompson et al., 2006).

전체 참여기관에서 제출한 측정값에서 Grubbs test에 의한 통계검정으로 emamectin benzoate는 2개 기관(6.0%)이

Table 6. Stability of pesticide formulations at room temperature for 14 days

Pesticide	Difference	Critical value
Emamectin benzoate	0.002	0.005
Lufenuron	0.007	0.021

Table 5. Estimation of accuracy for formulation of emamectin benzoate and lufenuron

Pesticides	Nominal A.I.[a)](%)	Mean A.I.(%)	95% Confidence interval	Mean% recovery
Emamectin benzoate	0.53	0.55±0.01	0.54~0.56	102.9
Lufenuron	2.00	1.95±0.01	1.94~1.96	97.7

[a)]Active ingredient.

Table 7. Homogeneity of pesticide formulations for proficiency test

Pesticide	Cochran's test	95% Critical value for outlier	Between-sample variance	Critical value for homogeneity
Emamectin benzoate	0.39	0.84	–0.000003	0.000173
Lufenuron	0.66	0.84	0.000025	0.001237

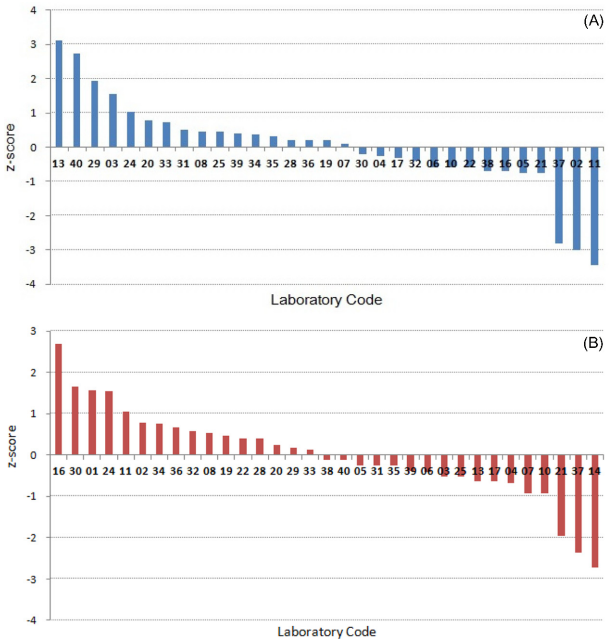

Fig. 5. z-scores for formulation of emamectin benzoate (A) and lufenuron (B).

이상값으로 판정되어 제외시켰으며, lufenuron는 이상값이 없는 것으로 확인되었다. z값에 의한 숙련도시험 평가를 수행하기 위하여 설정값은 emamectin benzoate 및 lufenuron에 대하여 각각 참여기관 측0.60% 및 2.15%, 목표표준편차는 각각 0.03 및 0.08이었으며, 참여기관들이 제출한 측정결과값의 정확성 및 분산정도를 바탕으로 z값을 산출한 후 평가기준에 적용한 결과, emamectin benzoate는 참여기관 총 33개 중 이상값은 2개 기관(6.0%), z값이 3.0이상인 부적합은 2개 기관(6.0%) 및 z값이 $2.0 < |Z| < 3.0$인 검토대상은 3기관(9.0%)이었고, lufenuron은 z값이 $2.0 < |Z| < 3.0$인 검토대상 3개 기관(9.0%)이었다(Fig. 5.). 두 시험약제에 대한 평가결과의 차이는 emamectin benzoate는 2가지 물질의 혼합물로 낮은 함량 및 분석법에 의한 영향이 있는 것으로 판단된다(Thompson et al. 2006). 국내 농약 이화학시험 분석기관을 대상으로 수행한 숙련도 시험결과, 90% 이상의 기관들이 적합범위에 포함되었으며, 분석방법 및 크로마토그램 등의 분석결과 생산자료 및 결과계산 등에 대한 과정이 전반적으로 양호한 것으로 확인되었다.

결론적으로, 농약이화학시험 분석기관의 수행능력 향상 및 품질보증을 위한 정도관리 체계마련은 다양한 제형 및 시험약제에 대하여 지속적인 숙련도시험 사례연구를 통하여 단계적으로 숙련도 시험방법을 체계화하는 것이 선행되어야 한다.

감사의 글

본 연구는 2012년 "농약시험 연구기관 정도관리체계 확립" 과제로 수행되었으며, 농촌진흥청의 연구비 지원에 감사드립니다.

Literature Cited

CIPAC (2011), Guidelines on method validation to be performed in support of analytical methods for agrochemical formulation, CIPAC document 3807.

Chang, H. J., J. Y. Lee, Y. J. Lee, H. R. Kang, K. Kim and C. S. Kim (2011) Quality control system for analytical chemistry laboratory of pesticide products, Korean J. Pestic. Sci. 15(4):529~544.

IAEA (2009), Quality control measures of pesticide products, IAEA-TECDOC-1612.

ISO/IEC 17043 (2010), Conformity assessment-General requirements for proficiency testing, first edition.

National Institute of Environmental Research (2009) Standard for quality control of analytical laboratory, Notification No. 2009-32.

Rural Development Administration, National Academy of Agricultural Science (2010) Standard methods for the analysis of pesticide products, No. 11-139802-000176-01.

Thompson, M. (2000) Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing, Analyst, 125:385~386.

Thompson, M., S. L. R. Ellison and R. Wood (2004) Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 74:835~855.

Thompson, M., S. L. R. Ellison, R. Wood (2006) The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.* 78(1):145~196.

농약 이화학시험 분석기관의 숙련도시험을 통한 정도관리체계 확립 연구

장희라* · 박효경 · 임영주[2] · 김광호[2] · 김찬섭[1] · 김 균

호서대학교 대학원 바이오응용독성학과 및 안전성평가센터,
[1]농업과학기술원 농산물안전성부, [2]농촌진흥청 농자재산업과

요 약 숙련도시험 수행 및 분석법확립은 분석기관의 지속적인 시험결과에 대한 신뢰성 확보 및 시험기관의 분석능력 관리를 위한 정도관리 체계에 포함되는 항목이다. Emamectin benzoate 및 lufenuron 유제 시료에 대한 분석법 검증, 안정성 및 균질성을 확인한 후, 농약 이화학시험 분석기관(33개 기관)을 대상으로 두 약제에 대한 시료를 배포하여 숙련도시험을 수행하였으며, 분석기관의 수행능력을 z값으로 평가하였다. Emamectin benzoate는 참여기관 총 33개 중 이상값은 2개 기관(6.0%), z값이 $|Z| > 3.0$ 및 $|Z| < -3.0$ 범위을 나타내는 부적합은 2개 기관(6.0%) 및 z값이 $-2.0 < |Z| < -3.0$ 및 $2.0 < |Z| < 3.0$ 범위인 검토대상은 3기관(9.0%)이었고, lufenuron에 대한 z값의 범위가 검토대상인 기관은 3개(9.0%)였다. 본 연구는 국내 농약 이화학시험 분석기관에 적합한 정도관리 체계 마련을 위하여 숙련도시험의 적용가능성을 확인하였으며, 추가적으로 다양한 농약제품에 대한 숙련도시험을 수행하여 보완이 필요하다.

색인어 농약제제, 정도관리, 숙련도 시험, 분석법검증, 안정성, 균질성