



풋고추 농약다성분분석 정도관리용 분석표준물질 개발

김종환 · 최성길 · 오영곤 · 권영상 · 홍수명¹ · 성문현² · 이세자³ · 황선영³ · 서종수*

안전성평가연구소 환경독성연구센터, ¹국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과,
²남양주시농업기술센터, ³완주군농업기술센터

Development of Analytical Reference Material for Proficiency Test of Pesticide Multi-residue Analysis in Green-pepper

Jong-Hwan Kim, Sung-Gil Choi, Young-Gon Oh, Young-Sang Kwon, Su-Myeong Hong¹,
Mun-Hyun Sung², Se-Ja Lee³, Sun-Young Hwang³ and Jong-Su Seo*

Environmental Toxicology Research Center, Korea Institute of Toxicology, Jinju 52834, Korea

¹Department of Agro-food Safety, National Academy of Agriculture Science, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

²Namyangju-si Agricultural Technology Center, Namyangju 12140, Korea

³Wanju-Gun Agricultural Technology Center, Wanju 55310, Korea

(Received on July 20, 2016. Revised on September 5, 2016. Accepted on September 11, 2016)

Abstract This study was to develop the analytical reference material of green-pepper for multi-residue analysis of pesticides. According to the ISO Guide 35, ISO Guide 13528 and EURL-PT protocol, the homogeneity, stability, assigned value and uncertainty were calculated to assess if it was suitable to be used as the proficiency test or quality control. The values of the within-bottle standard variation (s_{wb}) and the between-bottle standard variation (s_{bb}) were 1.7~3.7% of assigned value according to the requirement of the ISO guide 35. And, the uncertainty (u^*_{bb}) due to inhomogeneity was 0.8~1.1% for all pesticides. The storage stabilities of ten-pesticides at various conditions were assessed. For all target pesticides, the slop (b_i) values were smaller than the corresponding values of $[t_{0.95, n-2} \times s(b_i)]$ specified by the ISO guide 35, indicating that there were no statistically significant decreases in the concentration of the target pesticides when the analytical reference material was stored at room temperature (20~30°C) for 7 days, freezing (-20°C) for 30 days and deep freezer (-80°C. except for bifenthrin, fenprothrin) for 245 days. For proficiency test by using it developed by Korea Institute of Toxicology, inter-lab test was performed with eight organization performing the residual pesticide analysis. We found that there were some different results among them. Some were assessed as questionable or unacceptable for two pesticides and one organization didn't analyze the six pesticides. From these results, this green-pepper analytical reference material containing ten-pesticides could be used as a tool for the proficiency test to improve the reliability or consistency for pesticide residue's results.

Key words Homogeneity, multi-residue of pesticides, residual pesticide, stability, uncertainty.

서 론

농약은 각종 병해충 및 잡초의 효율적인 방제와 농작물의 증산과 품질향상을 위하여 현대 농업에 있어 필수적인 농자

재이다. 하지만 농약 성분이 본질적으로 지니고 있는 독성과 잔류성으로 인하여 안전성 문제가 새로운 사회문제로 대두되고 있다. 이러한 잔류농약에 대한 농산물의 안전성을 확보하기 위해서는 잔류수준 평가를 위한 잔류농약검사가 필연적으로 요구되고 있다. 잔류농약 분석은 백만분의 1 (ppm, mg/kg) 이하의 분석 대상성분을 고감도로 검출하고 정량하는 분석방법이 매우 복잡하며, 분석기관마다 적용하

*Corresponding author
E-mail: jsseo@kitox.re.kr

는 전처리 및 분석방법이 다양하기 때문에 시험성적서에 대한 신뢰성을 확보하는 것은 매우 중요하다.

이와 같이 국내외적으로 분석시험기관의 시험결과에 대한 신뢰성 확보에 대한 중요성이 증대되면서 국제적인 기준에 적합한 검증절차의 필요성이 요구되고 있으며, 국내에서 농산물 안전성 확보를 위한 시험기관의 농약제품 분석법의 검증 절차를 포함한 정도관리 체계를 제안하는 연구가 수행되고 있다(Chang et al., 2011). 뿐만 아니라, 농산물의 잔류농약에 관한 인증표준물질 개발 및 평가에 관한 연구가 보고되고 있다(International database for certified reference material (COMAR), 2014; Grimalt et al., 2015; Otake et al., 2009; Otake et al., 2013; Yarita et al., 2014). 그러나 국내에서는 아직까지 시험분석결과에 대한 신뢰성을 검증하기 위한 잔류농약분석 표준물질 개발에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 잔류농약 분석결과에 대한 신뢰성 및 일관성을 검증하기 위하여 국내실정에 적합한 정도관리용 농약 다성분 표준물질의 개발과 적용이 필요하다. 최근 들어 환경화학분야의 분석측정방법이 더욱 정밀하게 나아가고 있는 추세이기 때문에 정도관리(quality control, QC)에 대한 중요성은 상당히 증가되고 있고 있으며, 이에 따라 정확한 측정농도와 불확실성을 검증하는 정도관리는 필수적으로 고려되어야 한다(Baek et al., 2004).

본 연구는 풋고추 시료를 사용하여 10종의 농약이 함유된 농약다성분 분석표준물질을 개발하기 위해 수행하였으며, 국제적으로 공인된 지침서(ISO Guide 35, 2006; KS A ISO Guide 35, 2005; ISO Guide 13528, 2005; KS Q ISO 13528, 2009)와 EURL-PT (European Union Reference Laboratories-Proficiency Test) 및 IUPAC, AOAC International Harmonized Protocol (Amadeo et al., 2014; Thompson et al., 2006)에 근거하여 균질성, 안정성, 인증값 및 측정불확도의 적합성을 평가하였다. 또한, 국내 잔류농약 분석기관 중 8곳의 기관을 선정 한 후, 정도관리 평가시험을 수행하여 농약다성분 분석표준물질에 대한 분석결과 값을 z-value 통계 방법에 따라 평가하여 본 연구에서 제시한 풋고추 시료를 이용한 다성분 농약 분석용 표준물질이 농약시험 분석기관간 비교실험에 활용되는 정도관리용 시료로 적용가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

대상농약성분 및 시약

풋고추는 마트에서 구입하여 분석표준물질에 해당하는 농

약성분이 검출되지 않은 것을 확인하는 과정을 거친 후 사용하였다. 분석표준물질의 조제에 사용된 농약은 2014년 농산물의 국가잔류 조사결과(National Agricultural Products Quality Management Service (NAQS), 2015) 자료를 검토하여 농산물 내 검출빈도가 높은 상위 10종(Bifenthrin, Chlorfenapyr, Chlorpyrifos, lambda-cyhalothrin, Fenitrothion, Fenpropathrin, Iprobenfos, Isoprothionlane, Kresoxim-methyl, Procymidone)의 농약성분을 선정하였다. 각각의 농약 성분은 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany)에서 구입하여 사용하였다.

저장표준용액(stock solution)의 조제와 분석시료의 전처리에 사용한 유기용매 acetone과 acetonitrile은 HPLC 등급으로 Burdick&Jackson (Muskegon, MI, USA)로부터 구입하여 사용하였고, QuEChERS법 추출을 위해 QuEChERS Extract Kit (magnesium sulfate; 98.5~101.5%, sodium chloride; ≥99.5%, sodium citrate; 99.9%, disodium citrate sesquihydrate; 99%)와 정제를 위해 사용된 QuEChERS dispersive SPE 2 mL (primary secondary amine(PSA), octadecylsilane end-capped, magnesium sulfate; 98.5~101.5%)은 Agilent (Boblingen, Germany)로부터 구입하여 사용하였다.

농약다성분의 동시분석법 확립

10종의 농약 표준품을 acetone으로 용해하여 100 ppm 또는 1,000 ppm 농도의 stock solution을 만든 후, acetone을 사용하여 각 농약성분이 0.03, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 ppm이 되도록 혼합용액을 조제하였다. 조제된 혼합용액으로부터 약 2 mL을 취한 후, GC-ECD 또는 NPD에 주입하여 각 농약성분에 대한 검량선을 작성하였다. 분석한 농약의 검출기명 분류는 Table 1과 같다.

회수율시험 농도는 분석표준물질과 동일한 농도가 되도록 풋고추 분말가루 5 g에 대상농약성분의 농도가 0.5 µg/g (bifenthrin, chlorfenapyr, lambda-cyhalothrin fenpropathrin, isoprothionlane, procymidone) 또는 1.0 µg/g (chlorpyrifos, fenitro thion, iprobenfos, kresoxim-methyl)이 되도록 처리한 후, 증류수 10 mL을 넣고 1시간 방치한 후, acetonitrile 10 mL과 ceramic homogenizer (Agilent Technologies)을 넣고 약 1분간 진탕하였다. 진탕한 시료는 원심분리기를 이용하여 4,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 상정액을 QuERChERS extraction kit (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g sodium citrate tribasic dihydrate, 0.5 g sodium citrate dibasic sesquihydrate)에 적용하여 1분간 진탕 후, 3,000 rpm (4°C)에서 5분 동안 원

Table 1. Pesticides categorized with instrumental detectors for multi-residue analysis

Analytical instrument	Analyzed pesticides
GC-ECD (7 pesticides)	Bifenthrin, Chlorfenapyr, Lambda-cyhalothrin, Fenpropathrin, Isoprothiolane, Kresoxim-methyl, Procymidone
GC-NPD (3 pesticides)	Chlorpyrifos, Fenitrothion, Iprobenpos,

Table 2. GC-ECD/NPD conditions for the analysis of 10 pesticide residues

Instrument	Agilent Technology 7890A
Column	DB-5, 30 m × 0.320 mm, 0.25 m
Injector	Temperature: 250°C Injection vol.: 1 µL, splitless
Oven	<For ECD analysis> Initial temperature: 100°C (5.5 min) Rate & temperature: 10°C/min → 200°C (3.5 min) → 8°C/min → 280°C (15 min) → 10°C/min → 300°C (5 min) <For NPD analysis> Initial temperature: 80°C (2 min) Rate & temperature: 10°C/min → 200°C (0 min) → 2°C/min → 220°C (4 min) → 10°C/min → 300°C (4 min)
Carrier gas	Flow rate: 1.0 mL/min (N ₂ gas)
Detector	ECD-Temperature: 300°C Make up gas: 60 mL/min NPD-Temperature: 320°C N ₂ gas: 3 mL/min H ₂ gas: 5 mL/min Air gas: 120 mL/min

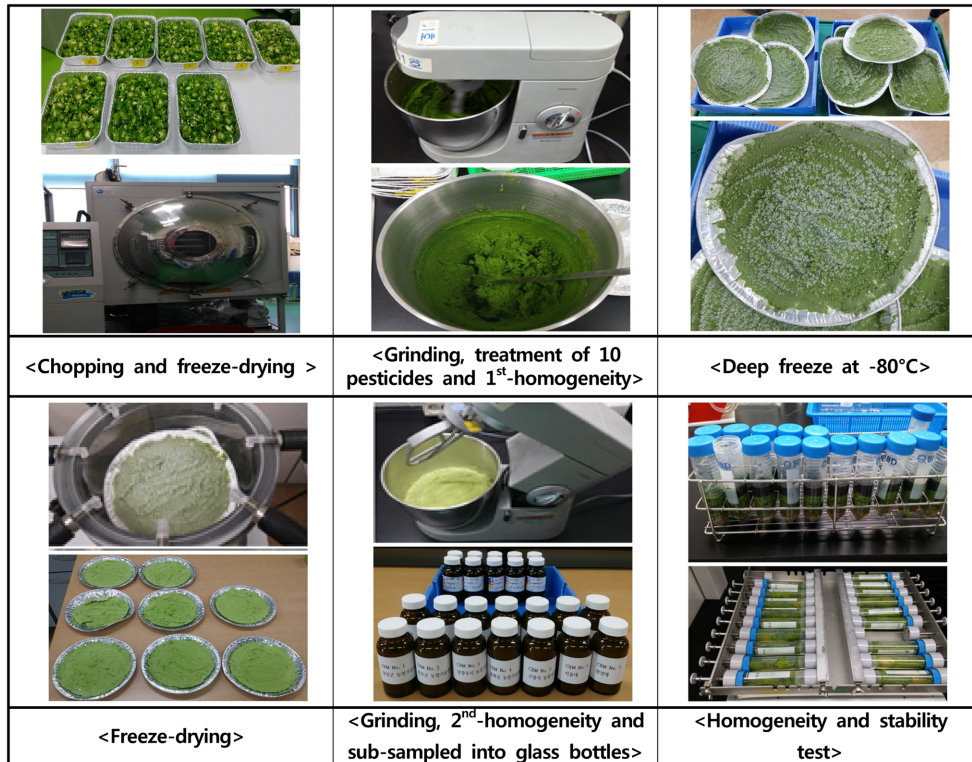


Fig. 1. Procedure for development of analytical reference material of a green-pepper.

심분리하여 추출액과 시료층이 분리되도록 하였다. 상정액 7 mL을 취하여 QuERChERS d-SPE-5 mL kit (900 mg MgSO₄, 150 mg PSA, 150 mg C18E)을 넣고 1분간 진탕한 뒤, 3,000 rpm (4°C)에서 5분 동안 원심분리 하였다. 상정액 3 mL을 취하여 N₂ gas로 농축한 후, acetone 1.5 mL로 정용 하였으며, 이 중 1 mL을 취하여 QuERChERS d-SPE-2 mL kit (150 mg MgSO₄, 25 mg PSA, 25 mg C18E)을 넣어 1분간 vortex mixer로 혼합하였다. 원심분리기로 12,000 rpm

(4°C)에서 5분간 원심분리 한 후, 상정액 0.5 mL과 acetone 0.5 mL을 혼합하고 PTFE 0.2 µm syringe filter로 여과하여 Table 2의 분석조건에 따라 3반복으로 수행하였다.

분석표준물질의 조제

분석표준물질의 조제는 일정한 크기로 세절한 풋고추를 동결건조 한 후, 분쇄하여 미세한 분말가루 형태로 만들었다. 분쇄한 풋고추 분말가루 1 kg에 acetone으로 용해된

1,000 µg/mL 용액을 0.5 mL 및 1.0 mL을 처리하여 각 농약 성분이 0.5 µg/g (Bifenthrin, Chlorfenapyr, Cyhalothrin-lambda, Fenpropathion, Isopro thionlane, Procymidone) 또는 1.0 µg/g (Chlorpyrifos, Fenitrothion, Iprobenfos, Kresoxim-methyl) 이 되도록 처리하고 증류수 500 mL을 넣어 약 1시간 동안 혼합하였다. 초저온(-80°C)에서 약 1일 동안 동결 시킨 후, 약 7일 동안 동결건조하여 수분을 제거하였다. Grinder로 30분 동안 분쇄하여 풋고추 분말시료 내에 10종의 농약성분이 균질하게 분포되도록 분석표준물질을 조제하였다(Fig. 1).

균질성

균질성 시험을 위해 분석표준물질 50 g을 100 mL 갈색 bottle에 옮겨 담은 후, 무작위로 10개의 bottle를 선정한 후, 5 g씩 3반복 채취하여 병간(between- bottle)과 병내(within-bottle)의 균질성을 확인하였다. 제조된 분석표준물질에 대한 균질성은 KS Q ISO Guide 13528(2009), KS A ISO Guide 35(2005) 및 EURL-PT protocol (Amadeo et al., 2014)의 방법을 적용하여 평가하였다.

KS Q ISO Guide 13528에서 제시하는 균질도 평가는 아래의 공식 (1), (2), (3)에 따라 시료간의 시료 내(s_w)와 시료간의 표준편차(s_s)를 구하였으며, 본 시험의 허용표준편차(σ)는 인증값(설정값)의 25%를 설정하여 계산하였다.

$$s_x = \sqrt{\sum(X_{r..} - \bar{X}..)^2 / (g-1)} \tag{1}$$

$$s_w = \sqrt{\sum w_i^2 / 2g} \tag{2}$$

$$s_s = \sqrt{S_x^2 - (S_w^2/2)} \tag{3}$$

X_i : 균질도 평가를 위해 측정된 데이터

\bar{X} : 전체평균

t : 병간시료 ($t=1, 2, \dots, g$)

W_i : 시험용 시료간의 범위

s_x : 시료평균의 표준편차

s_w : 시료 내 표준편차

s_s : 시료 간의 표준편차

KS A ISO Guide 35에 제시하는 방법에 따라 병간 표준편차(between-bottle variance, s_{bb})와 병내 표준편차(within-bottle variation, s_{wb})를 5% 유의수준에서 아래의 공식 (4), (5)에 따라 산출하였다. 본시험의 n_0 은 누락된 데이터가 없기 때문에, 분석결과 수 n 과 같았다.

$$s_{bb} = \sqrt{s_a^2 - \frac{M_{among} - M_{within}}{n_0}} \tag{4}$$

$$s_{wb} = \sqrt{M_{within}} \tag{5}$$

s_a : 병간의 분산

M_{among} : 병간의 평균제곱

M_{within} : 병내의 평균제곱

n_0 : 각 bottle의 분석결과 수 (=n)

또한, 유럽에서 제시하는 EURL-PT의 공식 (6), (7)에 따라 Cochran's test를 수행하여 이상치(outlier)를 확인한 후 F-검정에 의한 분석시료들의 허용편차 기준값을 산출하고 시료들의 분석결과 편차가 기준값 이내 인 것을 확인하였다 (Kim et al., 2010; Thompson et al., 2006). 본 시험의 허용 표준편차는 인증값(설정값)의 25%를 설정하여 계산하였다.

$$s_s^2 = s_x^2 - (s_w^2/2) \tag{6}$$

$$c = F_1(0.3\sigma_{all})^2 + F_2s_w^2$$

s_s : 시료 간의 표준편차

s_x : 시료평균의 표준편차

s_w : 시료 내 표준편차

σ_{all} : 인증값의 허용표준편차

F_1, F_2 : 1.88, 1.01

안정성 및 수분함량

안정성시험은 균질성이 확인 된 분석표준물질이 각 분석기관에 송부될 때 실온상태에서 배송되고, 다양한 조건 하에 보관 후, 분석하는 상황을 고려하여 실온(20~30°C)에서 7일, 냉동(-20°C)에서 30일, 초저온 조건(-80°C)에서 245일 동안 보관하면서 풋고추 분석표준물질 내의 각 농약성분의 안정성을 확인 하였다.

안정성의 적합성 여부는 KS A ISO Guide 35(2005)에서 제시하는 아래의 공식 (8)~(11)을 적용하여 확인하였다.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X}) - (Y_i - \bar{Y})}{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2} \tag{8}$$

$$b_0 = \bar{Y} - b_1\bar{X} \tag{9}$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}} \tag{10}$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (Y_i - b_0 - b_1X_i)^2}{n-2} \tag{11}$$

b_1 : 기울기
 b_0 : 회귀선의 절편
 X_i 와 Y_i : 시간 경과와 시간경과에 따른 상대적인 농도
 \bar{X}, \bar{Y} : X_i, Y_i 의 평균값

수분함량의 측정은 균질화된 시료 0.5 g을 취하여 desiccator (P_2O_5)안에서 1주일 동안 방치 한 후, 질량변화를 측정하였으며 3반복 수행하였다.

인증값(설정값) 및 표준불확도의 산출

인증값은 균질성이 확인된 분석표준물질을 30반복 추출 및 분석하여 산출된 평균값을 적용하였으며, KS A ISO Guide 35(2005)에서 제시하는 병간 불균질성으로 인한 표준 불확도(u_{bb})는 아래의 공식 (12)에 따라 산출하였다.

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{M_{within}}{n} \cdot 4 \sqrt{\frac{2}{vM_{within}}}} \quad (12)$$

M_{among} : 병간의 평균제공
 M_{within} : 병내의 평균제공
 vM_{within} : M_{within} 의 자유도 수
 n : 시료의 갯수

속련도 평가

균질성, 안정성, 표준불확도 그리고 수분함량이 적합한 농약다성분 꽃고추 분석표준물질을 잔류농약 분석을 수행하는 8기관에 송부하여 꽃고추 분석표준물질 내에 함유되어 있는 10종의 농약성분에 대한 정량(quantification)과 정성(qualitative) 분석을 할 수 있도록 하였으며, 정량/정성분석 시 30종의 농약 solution과 list를 제공하여 비교분석 할 수 있도록 하였다. 각 시험소의 정도관리평가는 KS Q ISO Guide 13528(2009)에 제시된 아래의 공식 (13)에 따라 z-value의 통계치리로 전환된 z값을 평가기준을 적용하였다(Table 3).

$$z = (x - X) / \sigma \quad (13)$$

x : 참가시험기관의 측정값
 X : 인증값(설정값)
 σ : 결과값의 분산정도(25%의 표준편차)

결 과

동시다성분 분석법의 확립

10종의 농약성분에 대한 분석장비 및 분석방법의 검출한계, 직선성 그리고 회수율의 결과는 Table 3과 같다. 회수율은 88.7~138.6%였으며, 변동계수(coefficient of variation)은 0.03% 이하였다. 그리고, 직선성은 모든 농약성분이 0.999 이상으로 우수하여 분석표준물질의 인증값(설정값)을 산출

Table 3. Interpretation of z-score for proficiency testing

z-score range	Assessment
$ z \leq 2$	Acceptable
$2 < z \leq 3$	Questionable
$ z > 3$	Unacceptable

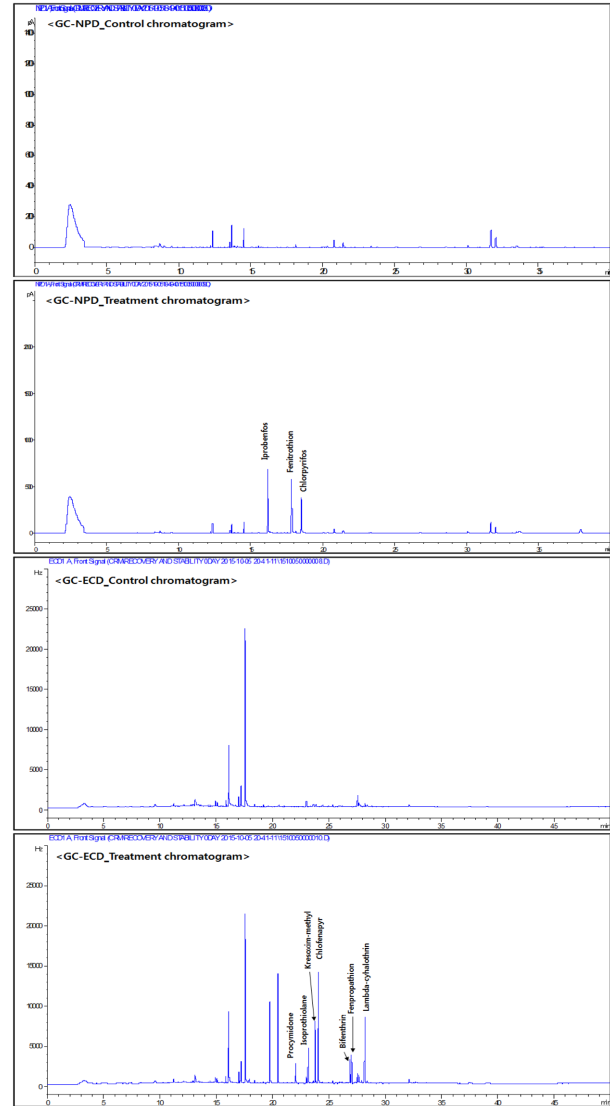


Fig. 2. Chromatograms of control and treated samples for 10 pesticides by GC-NPD and ECD analysis.

하는데 적합하였다(Table 4). 또한, 농약을 처리하지 않은 무처리시료에서 불순물에 의한 방해 또는 간섭요인은 확인되지 않았다(Fig. 2).

농약다성분 꽃고추 분석표준물질의 적합성

농약다성분 꽃고추 분석표준물질의 적합성여부는 균질성, 표준불확도, 안정성, 수분함량의 결과를 바탕으로 확인하였다. 균질성이 적합하지 못할 경우에는 속련도평가의 적합성 평가에 매우 심각한 문제가 발생할 수 있기 때문에 균질성

Table 4. Results of method validation for 10 pesticides

Pesticides	Applied conc. ($\mu\text{g/g}$)	LOD (ng^{a})	MDL ($\mu\text{g/g}^{\text{b}}$)	Linearity (r^2)	Recovery (%) ($\text{CV}^{\text{c}}\%$)
Bifenthrin ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	88.7 \pm 0.02 (0.02%)
Chlorpyrifos ^e	1.0	0.02	0.04	>0.999	88.8 \pm 0.01 (0.01%)
Chlorfenapyr ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	118.3 \pm 0.02 (0.02%)
Lambda-Cyhalothrin ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	138.6 \pm 0.03 (0.02%)
Fenitrothion ^e	1.0	0.02	0.04	>0.999	102.7 \pm 0.01 (0.01%)
Fenpropathrin ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	118.3 \pm 0.03 (0.03%)
Iprobenfos ^e	1.0	0.02	0.04	>0.999	113.0 \pm 0.02 (0.02%)
Isoprothiolane ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	119.0 \pm 0.02 (0.02%)
Kresoxim-methyl ^d	1.0	0.02	0.04	>0.999	113.2 \pm 0.01 (0.01%)
Procymidone ^d	0.5	0.01	0.02	>0.999	98.3 \pm 0.02 (0.02%)

^aLimit of detection. ^bMethod detection Limit. ^cCoefficient of variation. ^dAnalyzed by GC-ECD. ^eAnalyzed by GC-NPD.

Table 5. Results of homogeneity test for 10 pesticides in analytical reference material of green-pepper

Pesticides	KS Q ISO 13528				EURL-PT Protocol			
	s_x	s_w	s_s	$0.3\sigma^{\text{a}}$	$s_s \leq 0.3\sigma$	s_s^2	c	$s_s^2 < c$
Bifenthrin	0.011	0.010	0.009	0.024	Accept	0.0001	0.0012	Accept
Chlorpyrifos	0.013	0.013	0.009	0.060	Accept	0.0001	0.0023	Accept
Chlorfenapyr	0.029	0.023	0.024	0.034	Accept	0.0006	0.0073	Accept
Lambda-Cyhalothrin	0.015	0.014	0.011	0.037	Accept	0.0001	0.0027	Accept
Fenitrothion	0.039	0.026	0.034	0.077	Accept	0.0012	0.0117	Accept
Fenpropathrin	0.010	0.010	0.007	0.030	Accept	0.0001	0.0018	Accept
Iprobenfos	0.037	0.024	0.033	0.075	Accept	0.0011	0.0112	Accept
Isoprothiolane	0.015	0.012	0.012	0.033	Accept	0.0001	0.0022	Accept
Kresoxim-methyl	0.022	0.021	0.016	0.070	Accept	0.0003	0.0097	Accept
Procymidone	0.021	0.007	0.020	0.032	Accept	0.0004	0.0020	Accept

^aThe value of 0.3σ was calculated as follows; $0.3 \times (\text{assigned values} \times \text{RSD } 25\%)$.

의 평가는 매우 중요한 사항이다(Kim et al., 2010). 본 시험에서 개발한 분석표준물질의 균질성은 KS Q ISO 13528 (2009)에서 제시하는 측정기준에 근거하여 평가한 결과, 대상 농약성분들의 시료 간의 표준편차(s_s) 값이 0.3σ 값보다 작아서 통계학적으로 균질성이 매우 우수하였으며, EURL-PT, IUPAC, AOAC International Harmonized Protocol에서 요구하는 Cochran's test를 통해 s_s^2 값이 c 값 보다 작아 각 농약성분이 매우 균질하게 분포되어 있음을 확인할 수 있었다(Table 5). 또한, 일원분산분석법(ANOVA test)에 의해 산출된 병내 표준편차(within-bottle variation, s_{wb})와 병간 표준편차(between-bottle variance, s_{bb})는 인증값(설정값)의 1.7~3.7%의 범위로 정도관리 및 숙련도 시험에 적용될 수 있는 분석표준물질인 것으로 확인하였다(Table 6).

표준불확도는 병간의 불균질성으로 인해 발생한 값으로서, KS A ISO Guide 35(2005)에서 제시하는 통계적인 방법으

로 산출된 각 농약성분들의 표준불확도는 인증값(설정값)의 0.8~1.1%로 매우 미미한 수준이었으며, 이 값은 정도관리 및 숙련도 평가에 미치는 영향이 매우 낮아 농약다성분 분석표준물질로 사용하기에 적합한 것으로 확인되었다(Table 6).

실온(20~30°C), 냉장(4~8°C), 냉동(-20°C), 초저온 상태(-80°C)에서의 풋고추 표준물질의 안정성 결과는 Table 7에 나타내었다. 안정성의 적합성 여부는 아래의 공식 (14)에 따라, 각 농약성분의 시간과 농도에 따른 추세선의 기울기 절대값(b_1)이 ISO Guide 35에서 제시하는 $s(b_1)$ 에 $n-2$ 자유도(degree of freedom)와 $p=0.95$ 일 때(95% 신뢰수준) Student's t -factor의 값을 곱한 값보다 작을 경우에 불안정성이 관찰되지 않은 것으로 판단하였다.

$$|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1) \quad (14)$$

풋고추 분석표준물질은 실온에서 7일, 냉동에서 30일 동

Table 6. Within-bottle (s_{wb}), between-bottle variation (s_{bb}) and uncertainty (u_{bb}) estimation from homogeneity test for 10 pesticides

Pesticides	Assigned value ($\mu\text{g/g}$)	s_{wb}		s_{bb}		u_{bb}	
		$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%	$\mu\text{g/g}$	%
Bifenthrin	0.32	0.011	3.5	0.005	1.4	0.003	1.0
Chlorpyrifos	0.80	0.022	2.8	0.020	2.5	0.007	0.8
Chlorfenapyr	0.45	0.014	3.0	0.010	2.2	0.004	0.9
Lambda-cyhalothrin	0.49	0.016	3.2	0.009	1.7	0.005	1.0
Fenitrothion	1.02	0.027	2.6	0.028	2.8	0.008	0.8
Fenpropathion	0.40	0.011	2.8	0.009	2.3	0.003	0.8
Iprobenfos	1.00	0.028	2.8	0.026	2.6	0.008	0.8
Isoprothiolane	0.44	0.014	3.2	0.013	2.9	0.004	1.0
Kresoxim-methyl	0.94	0.024	2.6	0.019	2.0	0.007	0.8
Procymidone	0.43	0.016	3.7	0.014	3.2	0.005	1.1

Table 7. Stability assessment at the various storage conditions

Pesticides	Storage conditions	b_1	b_0	$s(b_1)$	$t_{0.95,n-2} \times s(b_1)$	$ b_1 < t_{0.95,n-2} \times s(b_1)^{a)}$
Bifenthrin	Room temperature ^{b)}	-0.0038	0.2394	0.0014	0.0172	Accept
	Freezing ^{c)}	0.0005	0.2188	0.0009	0.0038	Accept
	Deep freezing ^{d)}	-0.0003	0.2366	0.0000	0.0001	Fail
Chlorpyrifos	Room temperature	-0.0041	0.4133	0.0131	0.1668	Accept
	Freezing	0.0009	0.3883	0.0010	0.0043	Accept
	Deep freezing	0.0002	0.3739	0.0003	0.0036	Accept
Chlorfenapyr	Room temperature	-0.0058	0.2951	0.0016	0.0204	Accept
	Freezing	0.0004	0.2809	0.0009	0.0039	Accept
	Deep freezing	-0.0003	0.2999	0.0000	0.0004	Accept
Lambdacyhalothrin	Room temperature	-0.0046	0.2960	0.0005	0.0070	Accept
	Freezing	0.0003	0.2695	0.0015	0.0064	Accept
	Deep freezing	-0.0002	0.2957	0.0000	0.0004	Accept
Fenitrothion	Room temperature	-0.0066	0.5138	0.0143	0.1817	Accept
	Freezing	0.0022	0.4893	0.0019	0.0083	Accept
	Deep freezing	0.0002	0.4671	0.0004	0.0054	Accept
Fenpropathrin	Room temperature	-0.0037	0.3035	0.0014	0.0180	Accept
	Freezing	0.0003	0.2820	0.0013	0.0055	Accept
	Deep freezing	-0.0006	0.2981	0.0001	0.0005	Fail
Iprobenfos	Room temperature	-0.0025	0.4504	0.0139	0.1769	Accept
	Freezing	0.0032	0.4223	0.0014	0.0059	Accept
	Deep freezing	0.0003	0.4082	0.0003	0.0040	Accept
Isoprothiolane	Room temperature	-0.0045	0.2838	0.0005	0.0064	Accept
	Freezing	0.0000	0.2703	0.0006	0.0028	Accept
	Deep freezing	0.0001	0.2821	0.0000	0.0002	Accept
Kresoximmethyl	Room temperature	-0.0085	0.6392	0.0024	0.0306	Accept
	Freezing	0.0008	0.6153	0.0015	0.0066	Accept
	Deep freezing	-0.0002	0.6502	0.0002	0.0021	Accept
Procymidone	Room temperature	-0.0019	0.2755	0.0017	0.0221	Accept
	Freezing	0.0009	0.3883	0.0010	0.0043	Accept
	Deep freezing	0.0001	0.2817	0.0001	0.0009	Accept

^{a)} $t_{0.95,n-2}=12.7$ for room temperature, deep freezing conditions and $t_{0.95,n-2}=4.3$ for freezing condition. ^{b)}For 7 days. ^{c)}For 30 days. ^{d)}For 245 days.

안 매우 안정한 것으로 확인하였으며, 초저온 상태에서는 245일 동안 bifenthrin, fenpropathrin 물질을 제외하고 안정성이 유지 되는 것을 알 수 있었다. Bifenthrin, fenpropathrin 은 초저온 보관에서 245일 동안 초기농도 대비 40~50%가 감소하여 장기보관은 어려운 것으로 판단되었으나, 냉동보관 최초 30일 이내의 기간 동안은 안정성이 유지 되는 것으로 보아 풋고추 분석표준물질은 농약분석기관에 적용하여 정도관리 및 숙련도 평가 시에는 활용될 수 있을 것으로 사료된다(Table 7).

풋고추 분석표준물질의 수분함량은 0.03%로 매우 낮아, 칭량 시 수분에 의한 보정 없이 사용할 수 있을 것으로 보여진다(Table 8).

숙련도시험

농약다성분 분석표준물질의 숙련도시험 검증을 위해 농촌진흥청의 협조로 농약시험분석 기관에 송부하여 숙련도시험을 수행하였다. 숙련도 시험에 참여한 8개 기관에서 제출한 측정 결과값의 정확성 및 분산정도를 바탕으로 z값을 산출한 후 평가기준에 적용한 결과, F 기관은 bifenthrin (2.0%) 과 cyhalothrin-lambda (2.3%) 농약성분에 대해서 의심스러운(questionable) 등급의 평가를 받았으며, D 기관은 iprobenfos (3.7%)이 부적합(unacceptable)을 받았으며 fenitrothion (2.3%) 은 의심스러운(questionable)등급으로 평가되었다. G 분석기

Table 8. Measurement of moisture content for analytical reference material

Bottle	Before (g)	After (g)	% ^{a)}
1	15.889	15.884	0.03
2	15.656	15.642	0.03
3	15.832	15.828	0.03

^{a)}(Weight of bottle (before, g) / Weight of bottle (after, g) × 100.

관에서는 6종의 농약성분(fenitrothion, procymidone, chlorfenapyr, bifenthrin, fenpropathrin, Lambda-cyhalothrin)을 검출하지 못하는 결과를 확인하였다(Table 9). 이와 같은 결과를 통해 분석표준물질의 숙련도 시험에 참여한 분석기관의 숙련도는 전반적으로 양호한 것으로 확인 되었지만 정도관리 체계마련을 위해 시험약제에 대한 숙련도 시험연구가 지속적으로 수행되어야 될 것으로 판단되었다.

결론

본 연구에서는 풋고추를 이용하여 국내에서 검출 빈도가 높은 10종의 농약성분이 함유된 농약다성분 풋고추 분석표준물질을 개발하였으며, 국제적으로 공인된 정도관리 지침서(ISO Guide 13528, 2005; ISO Guide 35, 2006)에서 요구하는 병내/병간의 균질성, 안정성, 인증값 및 표준불확도가 모두 적합함을 확인하였다. 개발된 농약다성분 풋고추 분석표준물질을 8개 농약시험분석기관을 선정하여 숙련도 시험을 검증한 결과 전반적으로 양호한 편이었으나 특정 분석기관에서는 6종의 농약성분이 검출되지 않았다. 동일한 분석표준물질에 대해 각 기관마다 상이한 결과는 농약잔류분석을 수행하는 각 기관간의 전처리 및 분석방법 그리고 숙련도 차이에 의한 것으로 판단되었다. 결론적으로 농약시험분석기관의 신뢰성을 향상시키기 위해서는 농약다성분 분석표준물질을 활용한 숙련도 시험연구를 지속적으로 수행하여 체계화 되어야 할 것으로 사료되었다.

본 연구를 통해서 농약다성분 분석표준물질을 사용하여 각 시험소의 분석방법을 검증할 수 있는 기회를 가질 수 있었으며, 추후 정도관리 및 숙련도 시험용으로 활용하여 각 기관의 현지조사 및 시험소의 평가에 적용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 9. Results of z-value for inter-lab test

Compound	Analyzed conc. (µg/g) / z-score (RSD 25%)							
	A	B	C	D	E	F	G	H
Iprobenfos	0.855/-0.6	0.633/-1.5	0.760/-1.0	1.927/3.7	0.790/-0.9	1.234/0.9	0.590/-1.7	0.817/-0.7
Fenitrothion	0.870/-0.6	0.570/-1.8	0.876/-0.6	1.613/2.3	0.850/-0.7	1.255/0.9	ND	0.825/-0.8
Chlorpyrifos	0.700/-0.5	0.429/-1.9	0.653/-0.7	0.983/0.9	0.740/-0.3	0.872/0.4	0.600/-1.0	0.675/-0.6
Kresoxim-methyl	0.842/-0.4	0.754/-0.8	0.795/-0.6	1.205/1.1	0.900/-0.2	0.959/0.1	0.650/-1.2	0.834/-0.5
Procymidone	0.433/0.0	0.412/-0.2	0.376/-0.5	0.565/1.2	0.490/0.5	0.424/-0.1	ND ^{a)}	0.399/-0.3
Isoprothiolane	0.468/0.3	0.450/0.1	0.403/-0.3	0.597/1.4	0.480/0.4	0.434/0.0	0.350/-0.8	0.460/0.2
Chlorfenapyr	0.397/-0.5	0.387/-0.6	0.355/-0.9	0.640/1.6	0.450/0.0	0.502/0.4	ND	0.355/-0.9
Bifenthrin	0.351/0.3	0.323/0.0	0.286/-0.5	0.447/1.5	0.390/0.8	0.485/2.0	ND	0.323/0.0
Fenpropathrin	0.364/-0.4	0.291/-1.1	0.332/-0.7	0.478/0.8	0.410/0.1	0.533/1.3	ND	0.345/-0.5
Lambda-cyhalothrin	0.401/-0.7	0.404/-0.7	0.341/-1.2	0.617/1.0	0.460/-0.3	0.768/2.3	ND	0.395/-0.8

A to H are analysis institutes. ^{a)}Not detected.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ01085702)의 지원에 의해 수행되었으며, 농촌진흥청의 연구비 지원에 감사드립니다.

Literature Cited

- Amadeo, R. and F. Alba (2014) EURL-Proficiency Test-FV-16, Pesticide Residue in Sweet Pepper Homogenate.
- Baek, S. O., K. H. Kim and G. S. Heo (2004) Air Quality Measurements and QC/QA(I)-Principles and Methodology. *J. KOSAE*, 20(2):237-249.
- Chang, H. R., J. Y. Lee, Y. J. Lee, H. R. Kang, C. S. Kim and K. Kim (2011) Quality control system for analytical chemistry laboratory of pesticide products. *The Korean Journal of Pesticide Science*, 15(4):529-544.
- Grimalt, G., S. Harbeck, P. Shegunova, J. Seghers, B. Sejerqøe-Olsen, H. Emteborg and M. Dabrio (2015) Development of a new cucumber reference material for pesticide residue analysis: feasibility study for material processing homogeneity and stability assessment. *Anal Bioanal Chem*, 407(11): 3083-3091.
- International database for certified reference material (COMAR), <http://www.comar.bam.de>. Accessed 3 mar 2014.
- ISO Guide 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2005, International Organization for Standardization.
- ISO Guide 35. Reference materials-General and statistical principles for certification. 2006, International Organization for Standardization.
- Kandler, W., R. Schuhmacher, S. Roch, P. Schubert-Ullrich and R. Krška (2004) Evaluation of the long-term performance of water-analyzing laboratories. *Accred. Qual. Assur*, 9(1): 82-99.
- Kim, Y. H., K. B. Song, S. K. Shin, J. S. Lee, G. T. Jeong, E. J. Hong, J. J. Park and S. M. Yu (2010) Preparation of wastewater-based reference materials for heavy metal analysis and interlaboratory study. *Analytical Science & Technology*, 23(3):295-303.
- KS A ISO Guide 35. Certification of reference materials—General and statistical principles. 2005, Korean Agency for Technology and Standard.
- KS Q ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. 2009, Korean Agency for Technology and Standard.
- National Agricultural Products Quality Management Service (NAQS). Results of safety and management for agricultural products. 2015. <http://www.naqs.go.kr>.
- Otake, T., N. Itoh, Y. Aoyagi, M. Matsuo, N. Hanari, S. Otsuka and T. Yarita (2009) Development of certified reference material for quantification of two pesticides in brown rice. *J. Agric. Food Chem*, 57:8208-8212.
- Otake, T., T. Yarita, Y. Aoyagi, Y. Kurida, M. Numata, H. Iwata, M. Watai, H. Mitsuda, T. Fujikawa and H. Ota (2013) Development of apple certified reference material for quantification of organophosphorus and pyrethroid pesticides, *Food Chemistry*, 138:1243-1249.
- Thompson, M., S. L. R. Ellison and R. Wood (2006) The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. *Pure Appl. Chem*, 78(1):146-196.
- Yarita, T., T. Otake, Y. Aoyagi, Y. Kuroda, M. Numata, H. Iwata, M. Watai, H. Mitsuda, T. Fujikawa and H. Ota (2014) Development of soybean certified reference material for pesticide residue analysis. *Talanta*, 119:255-261.

● ● 풋고추 농약다성분분석 정도관리용 분석표준물질 개발

김종환 · 최성길 · 오영곤 · 권영상 · 홍수명¹ · 성문현² · 이세자³ · 황선영³ · 서종수*

안전성평가연구소 환경독성연구센터, ¹국립농업과학원 농산물안전성부 화학물질안전과,
²남양주시농업기술센터, ³완주군농업기술센터

요 약 본 연구는 풋고추 시료를 이용하여 농약다성분 분석표준물질을 개발하기 위해 수행하였다. 10종의 농약성분을 풋고추 시료에 처리하여 균질하게 분포될 수 있도록 조제하였으며, 국제적인 지침서인 ‘ISO Guide 35’, ‘ISO Guide 13528’ 그리고 ‘EURL-PT’에서 요구하는 균질성, 안정성, 인증값 및 표준불확도가 확립된 농약다성분 풋고추 분석표준물질을 개발하였다. 개발된 분석표준물질의 병간 표준편차와 병내 표준편차는 인증값의 1.7~3.7%로 매우 우수한 균질성을 나타냈으며, 불균질성에 의한 표준불확도는 인증값의 0.8~1.15% 매우 낮아 분석표준물질로 사용하기에 매우 적합하였다. 다양한 조건에서의 안정성을 확인한 결과, 실온(20~30°C)에서는 7일, 냉동(-20°C)에서는 30일 동안 안정하였으며, 초저온 상태(-80°C)에서는 bifenthrin, Fenpropathrin을 제외한 8종이 245일 동안 안정하였다. 개발된 농약다성분 풋고추 분석표준물질을 사용하여 잔류농약을 분석하는 8기관의 시험소를 평가한 결과, 일부기관에서는 6성분을 검출하지 못하였으며 일부 농약성분에 대해서는 의심스러운(questionable) 또는 부적합(unacceptable)의 평가를 받았다. 동일한 분석표준물질에 대해서 각 기관마다 분석결과와 차이가 나타나는 것을 확인하였으며, 이런 결과를 통해서 잔류농약의 분석결과 신뢰성과 일관성을 향상시키기 위해 풋고추 분석표준물질을 활용한 정도관리 또는 숙련도 평가시험이 필요할 것으로 보인다.

색인어 농약다성분, 잔류농약, 균질성, 표준불확도, 안정성

● ●