

어린이용품 함유 이소티아졸리논계 보존제류 -
액체크로마토그래피/질량분석법(함량)

2024

(Determination of isothiazolinone preservatives in
children's products- Liquid chromatography/mass
spectrometry)

1.0 개요

1.1 목적

본 시험방법은 어린이용품에 함유되어 있는 이소티아졸리논계 보존제류의 농도를 측정하기 위한 방법으로, 보존제가 함유되어 있는 시료를 용매로 직접 추출 후 액체크로마토그래피/질량분석기 (LC/MS, liquid chromatograph/mass spectrometer)로 정성 및 정량하는 방법이다.

1.2 적용범위

1.2.1 본 시험방법은 어린이용품에 함유되어 있는 이소티아졸리논계 보존제류 5종 (표 1)의 함량을 측정하는 액체크로마토그래피/질량분석법 (LC/MS, liquid chromatography/mass spectrometry)이다.

1.2.2 보존제의 분석방법 검출한계는 표 2에서 제시된 값 (0.08 ~ 0.3) $\mu\text{g/g}$ 이하를 만족해야 한다.

1.2.3 본 시험방법에 따라 시험할 경우 정량한계는 표 2에서 제시된 값 (0.25 ~ 1.00) $\mu\text{g/g}$ 이하를 만족해야 한다.

1.3 간섭 물질

1.3.1 분석 결과에 오류를 가져올 수 있는 주요 오염원으로는 산, 시약, 유리 기구 및 그 외 분석 중에 사용되는 모든 기구 등이다. 모든 시약은 순도 및 불순물의 종류와 함량을 고려하여 사용한다. 각 실험실에서는 바탕시료 (reagent blank)의 측정을 통해 오염원의 영향 유무나 수준에 대하여 평가한다.

1.3.2 유리 기구류의 적합한 세척은 매우 중요하다. 잘못 세척된 유리 기구류는 분석 과정 중 시료를 오염시킬 수 있으며, 유리 표면에 분석물질이 흡착될 경우 목적성분이 손실될 우려가 있으므로 적합한 세척 방법을 사용해야 한다.

1.3.3 유리 기구류는 마지막 사용 용매로 한번 행구어 준 후 바로 세제로 씻는다. 세제 용액에 유리 기구를 넣고 30분간 초음파 세척한 후, 뜨거운 물, 수돗물, 정제수 순으로 행군다. 열에 안정한 물질의 경우 증류수 세척만으로는 잘 제거되지 않기 때문에 다시 아세톤, 헥세인의 용매 순으로 각각 3회 행군 후 105 °C 오븐에서 1시간 이상 건조하여 사용한다.

1.3.4 시약이나 용매는 특급 이상의 것을 사용하고, 필요한 경우 증류나 정제 과정을 통해 불순물의 방해로 인한 문제를 최소화 하도록 한다.

2.0 용어정의

2.1 보존제

분석 대상 보존제는 표 1과 같다.

표 1. 분석대상 보존제

물질	영문명	CAS No.
1,2-벤즈아이소티아졸-3(2H)-온	1,2-benzisothiazol-3(2H)-one	2634-33-5
2-메틸-4-아이소티아졸린-3-온	2-methyl-4-isothiazolin-3-one	2682-20-4
5-클로로-2-메틸-4-아이소티아졸린-3-온	5-chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	26172-55-4
2-옥틸-3(2H)-아이소싸이아졸논	2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	26530-20-1
4,5-다이클로로-2-n-옥틸-4-아이소티아졸린-3-온	4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothizaolin-3-one	64359-81-5

2.2 내부표준물질

내부표준물질은 분석하고자 하는 물질과 유사한 화학적 구조나 화학적 성질을 가지며 시료 매질 중에서는 발견되지 않은 유기화합물로 분석 방법의 재현성 및 정확성을 알아보기 위해 사용한다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 액체크로마토그래프/질량분석기 (LC/MS, liquid chromatograph/mass spectrometer)

3.1.1 LC 시스템은 (2 ~ 10) μL 용량의 시료를 반복적으로 주입할 수 있어야 하며, 농도 기울기 조절이 가능하고 분석 유량을 일정하게 유지할 수 있는 2차 펌프가 있는 시스템이 요구되며, 액체크로마토그래프에서 분석하는 유속 근처에서 전자분사이온화 (ESI, electrospray ionization)가 가능한 장비이어야 한다.

3.1.2 컬럼은 적절한 분해능, 피크모양, 정확도 및 정밀도를 가지는 역상 C18 액체크로마토그래프 컬럼 (2.1 mm $\times$ 50 mm, 4 μm 또는 동급 이상)을 사용해야 한다.

3.2 볼텍스 믹서 (vortex mixer)

볼텍스 믹서는 최대분당 3 000 rpm 이상의 진동으로 시료와 추출용매를 순간적으로 잘 혼합 할 수 있는 것이어야 한다.

3.3 전자저울

소수 넷째 자리까지 g 단위의 무게를 잴 수 있어야 한다.

3.4 초음파 추출장비 (ultrasonic bath)

초음파 추출장비는 온도와 시간, 초음파의 세기를 조절할 수 있는 장치를 사용한다. 온도 및 시간을 조절할 수 없다면, 추출시간과 온도를 확인하여 시료의 추출조건을 일정

하게 하여야 한다.

3.5 마이크로 피펫

(20 ~ 200) μ L 용량의 마이크로 피펫을 사용한다.

3.6 주사기 필터 (syringe filter)

0.45 μ m PTFE 주사기 필터를 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 메탄올 (methanol, CH_3OH , 32.04)

LC 급 이상의 용매를 이용하여야 하며 바탕시험 할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.1.2 정제수

바탕시험 할 때 표준물질의 피크 부근에 불순물 피크가 없는 것을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 표준원액 (1 000 mg/L)

순수한 물질 또는 고농도로 용매에 녹여 있는 것을 구입하여 사용하며, 용매에 녹아있지 않는 경우 순도가 높은 특급이상의 시약을 구입하여 사용한다. 실험에 사용하는 모든 혼합 표준용액은 적합한 작업 농도범위로 희석하여 사용한다.

표준용액은 표준원액을 메탄올을 이용하여 1 000 mg/L의 표준용액으로 조제한다.

4.2.2 표준용액 (100 mg/L)

표준원액을 메탄올로 희석하여 100 mg/L의 희석 표준용액을 제조한다. 표준용액을 단계별로 취하여 5개 ~ 6개의 표준물질을 준비한다.

4.2.3 내부표준물질 용액

메탄올로 치환된 시료에 isoproturon-d₆를 200 ng을 첨가하고, 최종부피가 1 mL가 되도록 조절한다.

[주 1] 실린지 첨가용 내부표준물질 (isoproturon-d₆)의 첨가 농도는 각 실험실의 기기 감도에 따라 조절하여 사용한다.

5.0 시료 채취 및 관리

5.1 시료의 준비

5.1.1 시료를 0.5 cm × 0.5 cm 정도로 가늘게 잘라 분쇄기 등을 이용하여 입자 크기 1 mm 이하로 분쇄한다.

[주 2] 시료에 따라 액체 질소를 사용하여 분쇄기에 열이 나는 것을 방지하도록 한다.

5.1.2 분쇄한 시료는 다른 재질의 시료들과 섞이지 않도록 주의하여 보관하며, 시료별 고유번호 또는 시료 명 등 정보를 기록하고 상세한 정보는 별도의 기록지에 같이 기록한다.



그림 1. 시료의 준비

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계 (MDL, method detection limit)

본 분석의 방법검출한계는 보존제가 함유되어 있지 않은 매질에 보존제류 표준용액을 정량한계 수준의 농도가 되도록 첨가하여 시료와 동일한 순서로 7회 반복 실험하여 측정값의 표준편차에 3.14를 곱한 값으로부터 구한다.

6.2 방법바탕시료의 분석

시료군마다 1개의 방법바탕시료를 분석한다. 방법바탕시료는 보존제가 없는 것으로 확인된 매질을 사용하여 시료와 동일하게 전처리·측정하며 측정값은 방법검출한계 이하이어야 한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

6.3.1 검정곡선은 정량범위 내 0점을 제외하고 최소 5개 이상의 농도로 작성하여야 하며, 검정곡선의 직선성은 결정계수 (R^2) 값이 0.99 이상이어야 하며, 허용범위를 벗어나면 재작성하도록 한다.

6.3.2 분석 중에 분석대상 시료 20개당 1개 이상의 표준용액 (중간 농도)을 검정곡선에 적용하여 분석하고, 분석농도가 당초 표준용액 농도의 15 % 이내에서 일치하여야 하며, 이를 벗어나는 경우에는 재작성 하여야 한다.

6.4 정확도 관리

6.4.1 유사한 매질의 인증표준물질 (CRM, certified reference material) 또는 이에 상당하는 표준물질을 사용하여 시료와 동일한 방법으로 전처리 및 분석하여, 4회 이상 반복한 평균 분석값이 인증값 범위 또는 인증값의 (70 ~ 130) % 내에 있어야 한다.

6.4.2 모든 시험에서 바탕시험을 실시하여 시료 측정 결과를 보정해 주어야 한다.

6.5 내부정도관리 주기 및 목표

6.5.1 방법검출한계, 정량한계, 정밀도 및 정확도는 연 1회 이상 측정하는 것을 원칙

으로 하며 분석자의 교체, 분석 장비의 수리 및 이동 등의 주요 변동사항이 생길 경우에는 다시 실시한다. 단, 장비의 청소, 컬럼 교체 시와 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인하여야 한다.

6.5.2 검정곡선 검증 및 방법바탕시료의 분석은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에 방법바탕시료를 측정하여 오염 여부를 점검한다.

6.5.3 각 정도관리 항목에 대한 정도관리 목표 값은 부록의 표 2와 같다.

7.0 분석 절차

7.1 전처리

7.1.1 시료 약 (1 ~ 5) g을 (10 ~ 20) mL 플라스크에 넣는다.

7.1.2 여기에 메탄올 (10 ~ 20) mL 가한 후 60분 이상 초음파 추출기로 추출한다.

7.1.3 시험관을 실온으로 방냉하고 0.45 μm 주사기 필터 (syringe filter)로 여과하여 분석용 시료로 한다.

7.2 측정 방법

시험용액을 액체크로마토그래피에 주입한다. 표준용액에 대하여 동일조건에서 액체크로마토그래피로 측정한다. 표준물질의 피크 면적으로부터 검정곡선을 작성하여 정량한다.

7.3 시료 분석 결과

7.3.1 정성분석

7.3.1.1 각 분석물질별 두 개의 선택이온이 정해진 머무름 시간에서 나타나야 한다.

7.3.1.2 각 분석물질들을 검출하기 위해서 크로마토그램 피크에 대한 신호 대 잡음비

(S/N, signal/noise)는 2.5보다 커야한다.

7.3.2 정량분석

7.3.2.1 검정곡선에서 얻어진 분석물질의 농도를 사용하여 다음의 식으로부터 시료 중 분석물질의 농도를 계산한다.

$$C_T = \frac{[C_I - C_0]}{W} \times f \times V \quad (\text{식 1})$$

여기서, C_T : 시료 중의 분석물질의 농도 ($\mu\text{g/g}$)

C_I : 시료의 분석물질 농도($\mu\text{g/L}$)

C_0 : 방법바탕시료의 분석물질 농도($\mu\text{g/L}$)

f : 희석배수(검정곡선의 범위를 벗어날 경우)

V : 시료 추출용액의 부피(mL)

W : 시료의 무게(g)

8.0 결과 보고

8.1 분석 결과 보고

8.1.1 시료 채취 관련 자료

시료 목록, 시료 번호, 시료 채취 일자 등을 보고한다.

8.1.2 분석 방법 자료

분석 일자, 시료량, 분해 과정, 분석기기 및 분석조건, 사용한 표준물질 등에 대한 자료를 보고해야 한다.

8.1.3 분석결과 자료

8.1.3.1 검정곡선 작성, 질량검정, 표준물질 및 바탕시료의 분석결과를 분석시료의

분석결과와 함께 보고한다.

8.1.3.2 방법검출한계, 정량한계 및 산출 근거를 보고한다.

8.2 결과의 표시

8.2.1 보존제농도 측정결과는 $\mu\text{g/g}$ (mg/kg) 으로 표기하며 소수점 이하 둘째 자리까지 구하고 반올림하여 첫째 자리로 표기한다.

8.3 결과 보고

8.3.1 농도 측정 결과는 $\mu\text{g/g}$ (mg/kg) 으로 표기하며 유효숫자 둘째 자리까지 구하고 반올림하여, 결과는 첫째 자리로 표시한다.

9.0 참고자료

9.1 안전확인대상 생활화학제품 시험·검사 기준 및 방법 등에 관한 규정 (화학물질 안전원고시 제2024-30호, 2024.04.30.)

9.2 환경오염공정시험기준 심의위원회 운영규정 (국립환경과학원예규 제823호, 2021.11.16.)

10.0 부록

표 2. 정도관리

정도관리 항목	정도관리 목표	
방법검출한계	1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	0.30 µg/g
	2-Methyl-4-isothiazolin-3-one	0.08 µg/g
	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.25 µg/g
	2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	0.30 µg/g
	4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	0.30 µg/g
정량한계	1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	1.00 µg/g
	2-Methyl-4-isothiazolin-3-one	0.25 µg/g
	5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	0.75 µg/g
	2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	1.00 µg/g
	4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	1.00 µg/g
검정곡선의 직선성 방법바탕시료 정밀도	결정계수 0.99 이상 방법검출한계 미만 15 %	

표 3. 분석대상물질의 선택 질량이온(예시)

분석대상물질	대상이온	
	정량이온(m/z)	정성이온(m/z)
1,2-Benzisothiazol-3(2H)-one	152	109, 77
2-Methyl-4-isothiazolin-3-one	116	101, 71
5-Chloro-2-methyl-4-isothiazolin-3-one	150	87, 135
2-Octyl-3(2H)-isothiazolone	214.1	102, 43.1, 57.1
4,5-Dichloro-2-n-octyl-4-isothiazolin-3-one	282	169.8, 57.1, 71

표 4. 액체크로마토그래프/질량분석기 조건(예시)

기기분석 조건				
액체크로마토그래프	컬럼	C ₁₈ Column (50 mm x 2.1 mm, 2.6 μm)		
		A : 10mM Ammonium formate +0.1% Formic acid in Water		
		B : Methanol		
	이동상	Time (min)	A (%)	B (%)
		0	80	20
		2	80	20
		4	70	30
		8	10	90
		11	10	90
		12	80	20
16	80	20		
주입구 온도	30 ℃			
주입량	1 μL			
이온화 분석모드	Positive ion electrospray			

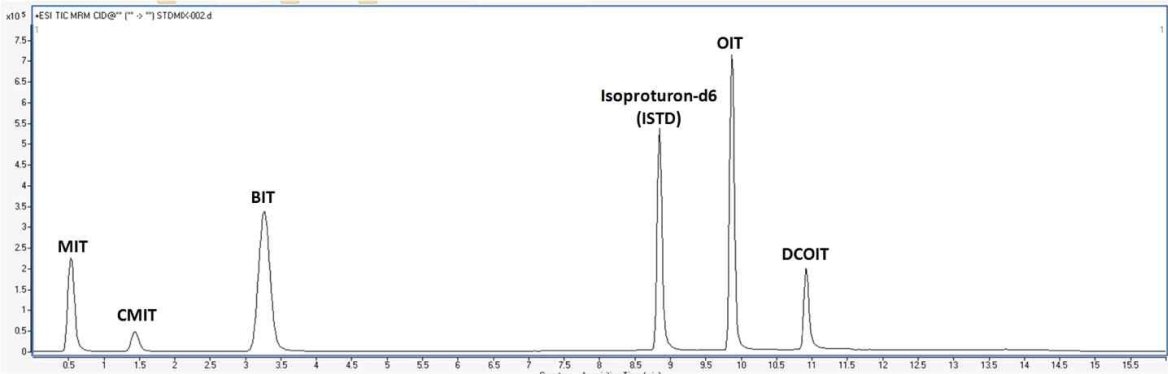


그림 2. 보존제류 표준물질 크로마토그램 (예시)