

6495C QQQ LC/MS를 이용한 완구류 내 니트로사민 불순물 17종 정량분석

저자

최나영, 류수민
한국애질런트테크놀로지스 (주)

개요

영유아들이 사용하는 장난감과 같은 어린이 제품은 유해물질로부터 그 안정성을 확보하는 것이 매우 중요합니다. 니트로사민은 잠재성의 발암물질로서 다양한 환경 매체에 존재하는 것으로 알려져 있으므로 완구류를 비롯한 어린이 제품에서의 관리 또한 요구되고 있습니다.

2021년 12월 산업통산자원부에서는 어린이 제품 공통안전기준 개정 고시를 발표하였으며, 해당 개정 고시에는 완구류 내 니트로사민 불순물에 대한 관리 기준이 포함되어 있습니다. 이에 한국애질런트는 개정된 시험법에 맞춰 기기 분석 솔루션을 제시하고자 합니다. 특히 이번 솔루션에서는 국내에서 규제하고 있는 니트로사민 7종 외 10종의 니트로사민 화합물을 추가하여 향후 확장될 수 있는 성분들에 대한 분석 가능성을 확인하고자 하였습니다.

본 실험은 어린이 제품 중 고무풍선에서의 니트로사민 및 니트로사민 생성 가능물질을 분석하기 위해 인공타액을 이용한 실험을 진행하였습니다. 분석법은 검량선의 선형성($R^2 \geq 0.996$), 반복분석을 통한 정밀성(%RSD $\leq 5\%$), 회수율을 통한 정확성(80 % ~ 133 %)을 통하여 평가하였습니다. 이번 실험에서 사용된 고무풍선에서의 니트로사민 및 니트로사민 생성 가능물질은 국내에서 관리하는 허용치 미만으로 확인되었습니다.

서론

니트로사민은 니트로소($N=N=O$) 작용기가 포함된 $R_2N-N=O$ 형태의 유기화합물로서, 2차 및 3차 아민과 아질산염이 반응하여 형성됩니다. 니트로사민 생성 가능물질은 니트로사민의 전구체로, 산성 조건(위액)에 놓이면 니트로화 반응에 의해 니트로사민을 형성하는 물질입니다. 니트로사민은 알킬기의 종류에 따라 다양한 구조를 형성하며, 일부 니트로사민은 유전적 변이를 일으키는 잠재성의 발암물질(Mutagenicity)로 알려져 있습니다. 국제 암연구기관(IARC)에서는 니트로사민을 발암을 일으킬 수 있는 발암 가능물질인 Group 2A(probably carcinogenic to humans) 및 Group 2B(possibly carcinogenic to humans)로 분류하고 있으며, 대표적으로 N-니트로소디메틸아민(NDMA), N-니트로소디에틸아민(NDEA)은 Group 2A 화합물로 분류됩니다. 이러한 니트로사민 및 니트로사민 생성 가능물질은 특정 식품, 화장품, 고무 제품 뿐 아니라 다양한 환경 매체에 존재할 수 있습니다. 2018년도에는 어린이들의 장난감으로 널리 쓰이는 고무풍선에서 니트로사민류와 니트로사민류 생성 가능물질이 검출된 바 있습니다. 이에 국내에서는 어린이 제품 안전특별법에 따라 특정 어린이 제품으로부터 용출되는 니트로사민류 및 니트로사민류 생성 가능물질에 대해 규제하고 있습니다. 현재 국내에서는 유럽연합의 시험방법을 기초로 총 7종의 니트로사민류에 대하여 규제하고 있습니다.

이번 응용 자료에서는 2016년에 발행된 EN71-12:2016 Safety of toys N-Nitrosamines and N-nitrosatable substances 시험방법과 2021년에 개정 고시된 국내 어린이 제품 공통안전기준을 참고하여 고무풍선 내 니트로사민 및 니트로사민류 생성 가능물질을 Agilent 6495C QQQ LC/MS를 이용해 분석했습니다. 한국애질런트는 두 시험법에서 규제하는 화합물을 포함하여 총 17종의 니트로사민류에 대하여 분석 가능성을 제시합니다.

실험

시료 전처리

니트로사민과 니트로사민 생성 가능물질의 분석은 모두 인공타액을 이용한 실험으로, 니트로사민 생성 가능물질은 산성 조건에서 니트로사민으로 전환될 수 있습니다.

실험에 사용되는 인공타액은 1L 부피 플라스크에 탄산수소나트륨 4.2g, 염화나트륨 0.5g, 탄산칼륨 0.2g, 아질산나트륨 0.03g을 950mL의 증류수에 녹인 뒤, 0.1N 염산용액 또는 0.1N 수산화나트륨 용액을 사용하여 pH를 9.0으로 조정합니다. 이 후 증류수를 가해 부피 플라스크 표선에 맞추어 제조한 뒤 이를 인공타액으로 사용합니다.

검정표준용액과 내부표준혼합용액을 조제하기 위하여, 니트로사민류 표준원액 17종과 내부표준원액 2종은 메탄올을 이용해 각각 10ppm, 1ppm으로 조제하여 중간표준혼합용액 및 내부표준혼합용액을 만들어 차광하여 냉동 보관합니다. 검정표준용액을 조제하기 위하여 중간표준혼합용액을 인공타액으로 희석하여 0.2ppb ~ 50ppb 범위가 되도록 1mL 조제한 뒤, 내부표준혼합용액 0.02mL을 더하여 준비합니다.

샘플의 전처리는 니트로사민 용출 및 니트로화 반응을 통해 진행됩니다. 샘플 전처리를 위해 고무풍선 3.5g ~ 4.5g을 35mL ~ 45mL의 인공타액으로 충분히 적신 뒤 40°C에서 1시간 동안 용출을 진행합니다. 용출이 끝난 후에는 더 이상의 용출을 막기 위해 따로 분리하여 시험용액으로 사용하고, 일부는 니트로화 반응을 진행합니다. 용출이 끝난 시험용액 중 5mL는 니트로화 반응을 위해 차광용기에 옮겨 담아 1N 염산용액 0.5mL과 혼합 후 40°C에서 30분간 반응시킨 뒤, 0.1N 수산화나트륨용액을 1mL 첨가하여 니트로화 반응을 종결시켜 시험용액으로 사용합니다. 용출 및 니트로화 반응이 끝난 시험용액 1.0mL에 내부표준혼합용액 0.02mL을 각각 첨가하여 검액으로 사용합니다.

분석 기기 및 조건

Agilent 1290 Infinity II UHPLC와 Agilent 6495C QQQ LC/MS가 본 분석에 사용되었습니다. UHPLC 분석 조건은 표 1, MS/MS분석에 대한 조건은 표 2, MRM 정보는 표 3에서 확인할 수 있습니다. 효율적인 시료 분석 및 획득된 데이터의 빠르고 편리한 처리를 위하여 Agilent MassHunter Acquisition(ver. 10.1), MassHunter Qualitative Analysis(ver. 10.0) 및 MassHunter Quantitative Analysis(ver. 10.2)를 사용하였습니다.

표 1. UHPLC 분석 조건.

구분	세부 조건		
분석 기기	Agilent 1290 Infinity II 고속 펌프 (G7120A) Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B) Agilent 1290 Infinity II Integrated Column Compartment (G7116B)		
자동 시료 주입기 온도	4°C		
주입량	20µL		
컬럼	ZORBAX Eclipse Plus C18, 3.0 x 100 mm, 1.8 µm		
컬럼 온도	40°C		
이동상 A	0.1 % Formic acid in Water (LC-MS grade)		
이동상 B	0.1 % Formic acid in Methanol (LC-MS grade)		
유속	0.6mL/min		
그레디언트	시간 (min)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
	0.0	95	5
	0.5	95	5
	2.0	40	60
	7.0	40	60
	8.0	5	95
	12.0	5	95
	12.1	95	5
	15.0	95	5

표 2. Agilent 6495C QQQ LC/MS 분석 조건.

구분	세부 조건
분석 기기	Agilent 6495C QQQ LC/MS
이온화원	Atmospheric-pressure chemical ionization (APCI)
수집모드	Dynamic MRM
극성	Positive
가스 온도	290°C
가스 유속	11L/min
Nebulizer	50psi
Vaporizer	350°C
캐필러리 전압	1500V
Corona Current	10µA
iFunnel (HRF/LRF)	90V/80V

표 3. 개별성분에 대한 MRM Transition.

	화합물명	전구 이온	생성 이온
1	NDELA	135.1	104.1, 74.2
2	NDMA-d6	81.1	46.1
3	NDMA	75.1	58.2, 43.2
4	NDiNA	299.3	71.2, 57.2
5	NMOR	117.1	87.1, 86.1, 45.2
6	NMBA	147.1	117, 44.2
7	NPYR	101.1	55.1, 41.1
8	NMEA	89.1	61.1, 43.1
9	NDEA-d10	113.1	34.2
10	NDEA	103.1	75.2, 47.2
11	NPIP	115.1	69.2, 41.3
12	EIPNA	117	75.1, 47.1
13	NDiPA	131.1	89.1, 43.3, 41.3
14	NDPA	131.1	89.1, 43.3, 41.3
15	NMPhA	137.1	107.1, 66.2, 51.2
16	NEPhA	151.1	77.1, 51.2
17	NDBA	159.2	103.1, 57.2, 41.2
18	NDiBA	159.2	103.1, 57.2, 41.2
19	NDBzA	227.1	91.1, 65.2

- 총 19성분에 대하여 Dynamic MRM으로 구성되어 있으며, 세부 정보는 애질런트를 통해 제공받을 수 있습니다
- 분석 조건은 분석의 정확도 및 정밀도가 확인되는 경우, 사용되는 분석 기기 및 분석물질 등에 따라서 변경될 수 있습니다

결과

본 응용 자료에서는 Agilent 6495C QQQ LC/MS를 이용하여 인공타액 내 니트로사민 17종에 대한 정량분석을 수행하였습니다. 분석은 2016년에 발행된 EN71-12:2016 Safety of toys N-Nitrosamines and N-Nitrosatable substance 시험방법을 기반으로 진행하였으며, 시험방법에 기재된 니트로사민 대상물질 13종(NDELA, NDMA, NDEA, NDPA, NDiPA, NDBA, NDiBA, NDiNA, NMOR, NPIP, NDBzA, NMPhA, NEPhA)과 추가 4종의 니트로사민류(NMBA, NPYR, NMEA, EIPNA)를 포함하여 총 17종의 니트로사민류에 대한 정량분석을 수행하였습니다. 분석물질 중 NDiNA 화합물은 시간이 경과함에 따라 감도가 감소할 수 있으므로, 측정전에 메탄올로 검정표준용액과 시험용액을 각각 1:1 (v/v)로 희석한 뒤 기기분석에 사용할 수 있습니다. 각 분석물질의 개별 이온 크로마토그램은 그림1에서 확인할 수 있습니다.

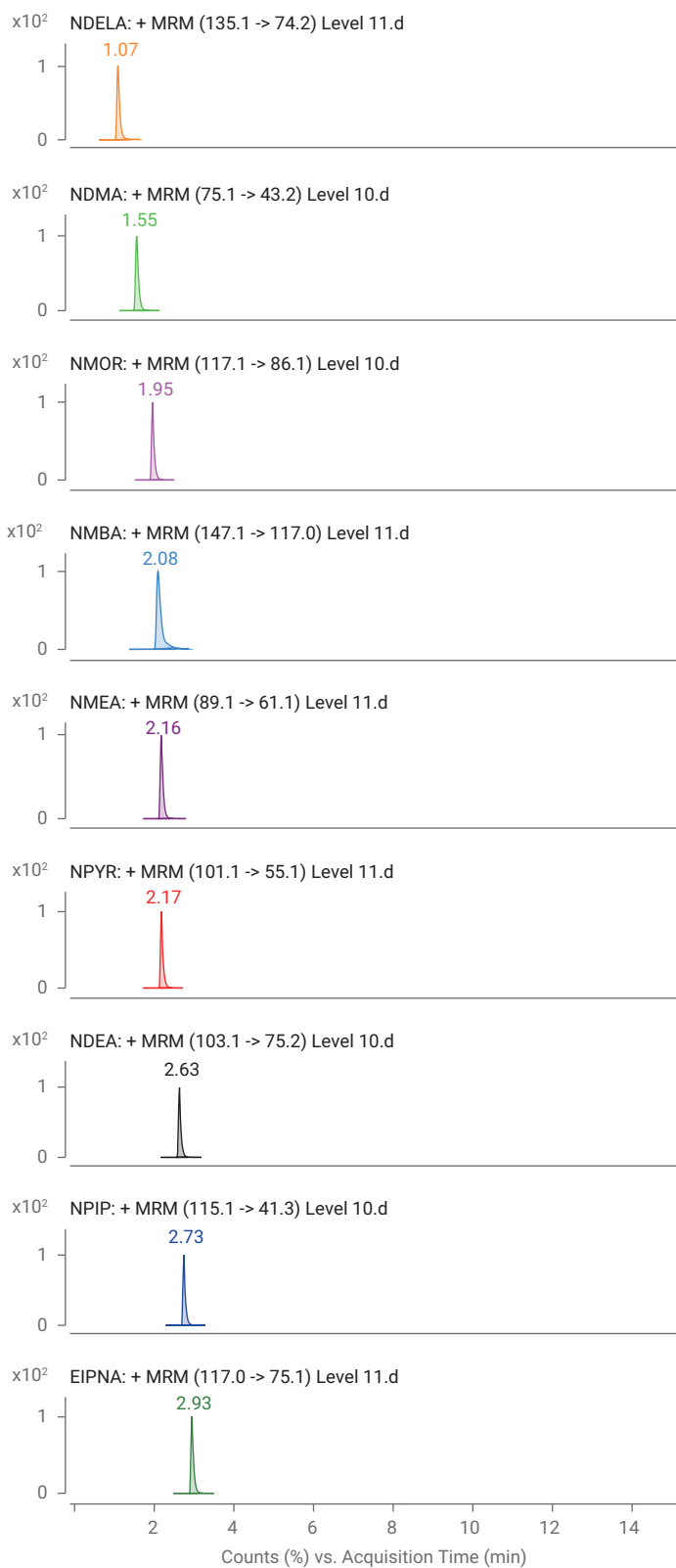


그림 1. 각 물질 별 정량이온 MRM 크로마토그램 (계속).

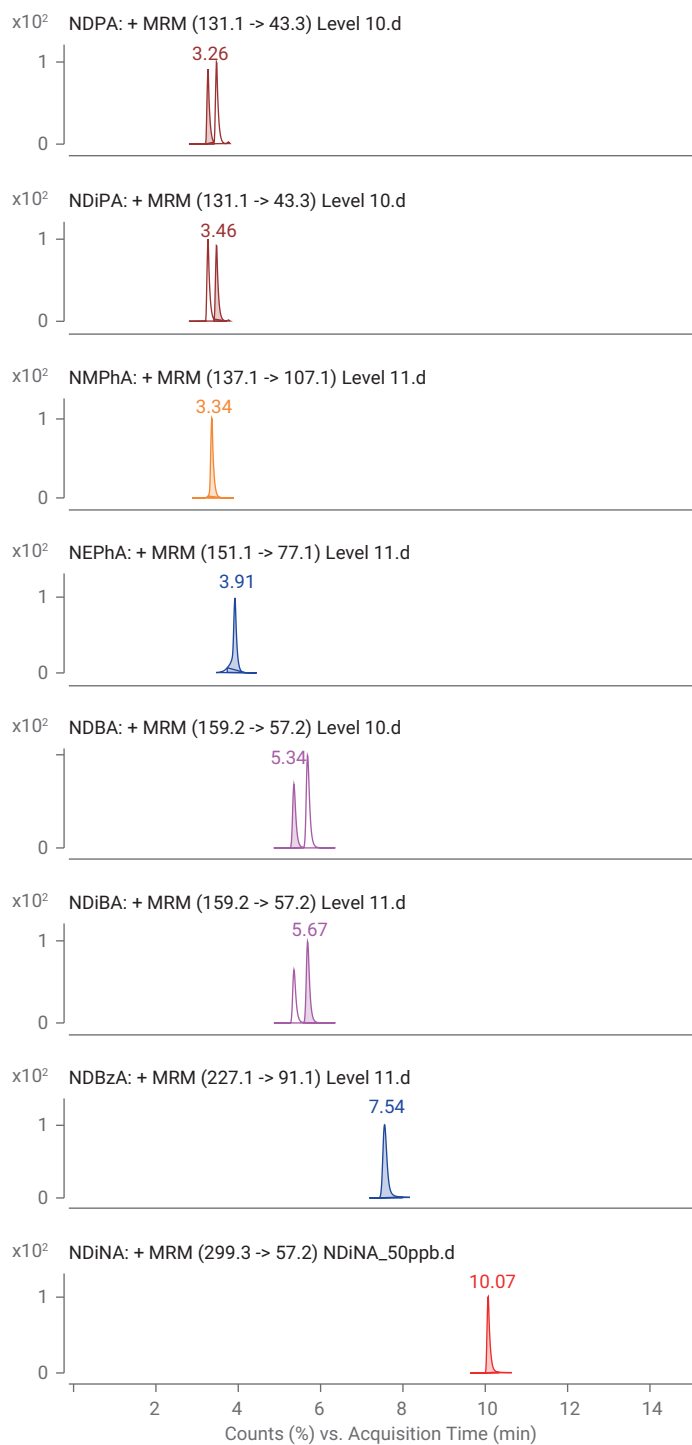


그림 2. 각 물질 별 정량이온 MRM 크로마토그램.

선형성 평가

니트로사민 16종은 0.2ppb ~ 50ppb 범위에서 5단계로 검량선이 작성되었고, NDiNA는 0.2ppb ~ 25ppb 범위에서 5단계로 검량선이 작성되었습니다. 각 성분에 대하여 최저 농도인 0.2ppb에서의 크로마토그램과, 검량선의 선형성 결과는 표 4에서 확인할 수 있습니다. 17종의 니트로사민은 모두 R^2 0.996 이상의 선형성 결과를 보이며, 검량농도의 최저 농도인 0.2ppb 수준에서도 안정적인 피크 검출을 보이고 있습니다.

표 4. 17종 니트로사민 0.2ppb에서의 크로마토그램 및 검량선.

성분명	크로마토그램	선형성	검량선
NDELA	Level 2 [NDELA] $\times 10^3$ 135.1 → 74.2	0.99665	NDELA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.183751 \cdot x - 5.303501E-004$ $R^2 = 0.99665042$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDMA	Level 1 [NDMA] $\times 10^3$ 75.1 → 43.2	0.99887	NDMA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.852184 \cdot x + 0.006632$ $R^2 = 0.99886789$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDiNA	NDiNA_0.2ppb [NDiNA] $\times 10^3$ 299.3 → 57.2	0.99765	NDiNA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 1.544011 \cdot x - 0.014444$ $R^2 = 0.99764882$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NMOR	Level 1 [NMOR] $\times 10^3$ 117.1 → 86.1	0.99966	NMOR - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.253553 \cdot x + 5.893343E-004$ $R^2 = 0.99965931$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NMBA	Level 2 [NMBA] $\times 10^3$ 147.1 → 117.0	0.99795	NMBA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.313609 \cdot x + 1.425462E-004$ $R^2 = 0.99794677$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NPYR	Level 2 [NPYR] $\times 10^3$ 101.1 → 55.1	0.99933	NPYR - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 2.078634 \cdot x + 0.004227$ $R^2 = 0.99932826$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NMEA	Level 2 [NMEA] $\times 10^3$ 89.1 → 61.1	0.99949	NMEA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.755870 \cdot x + 0.001492$ $R^2 = 0.99948613$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x

성분명	크로마토그램	선형성	검량선
NDEA	Level 1 [NDEA] $\times 10^3$ 103.1 → 75.2	0.99976	NDEA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.489313 \cdot x + 0.001181$ $R^2 = 0.99976112$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NPIP	Level 1 [NPIP] $\times 10^3$ 115.1 → 41.3	0.99947	NPIP - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 2.276495 \cdot x + 0.004486$ $R^2 = 0.99947479$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
EIPNA	Level 2 [EIPNA] $\times 10^3$ 117.0 → 75.1	0.99977	EIPNA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 1.343246 \cdot x + 0.003378$ $R^2 = 0.99976934$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDiPA	Level 1 [NDiPA] $\times 10^3$ 131.1 → 43.3	0.99981	NDiPA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 1.614605 \cdot x + 0.003374$ $R^2 = 0.99981033$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDPA	Level 1 [NDPA] $\times 10^3$ 131.1 → 43.3	0.99954	NDPA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 1.790728 \cdot x + 0.005643$ $R^2 = 0.99953675$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NMPaH	Level 2 [NMPaH] $\times 10^3$ 137.1 → 107.1	0.99974	NMPaH - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.457815 \cdot x + 0.001563$ $R^2 = 0.99974263$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NEPaH	Level 2 [NEPaH] $\times 10^3$ 151.1 → 77.1	0.99964	NEPaH - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 1.258379 \cdot x + 0.004386$ $R^2 = 0.99963693$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDBA	Level 1 [NDBA] $\times 10^3$ 159.2 → 57.2	0.99975	NDBA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 0.939010 \cdot x + 0.002715$ $R^2 = 0.99975448$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDiBA	Level 2 [NDiBA] $\times 10^3$ 159.2 → 57.2	0.99967	NDiBA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 3.022271 \cdot x + 0.008882$ $R^2 = 0.99966701$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x
NDBzA	Level 2 [NDBzA] $\times 10^3$ 227.1 → 91.1	0.99995	NDBzA - 5 Levels, 5 Levels Used, 5 Points, 5 Points Used, 0 QCs $y = 2.860845 \cdot x - 0.002883$ $R^2 = 0.99995230$ Type: Linear, Origin: Ignore, Weight: 1/x

재현성 평가

분석법에 대한 정밀성 확인을 위해, 1ppb(ng/mL) 농도로 제작된 검정표준용액을 6회 반복하여 재현성을 평가하였습니다. 재현성 평가는 각 니트로사민의 면적값을 적용된 내부표준품의 면적값으로 나눈 비율에 대하여 상대 표준편차(RSD, %)를 통해 평가하였고, 그 결과는 표 5에서 확인할 수 있습니다. 내부표준품은 NDMA-d6, NDEA-d10 2종을 사용하였고 NDELA, NDMA, NPYR, NMEA에는 NDMA-d6를 다른 13종에는 NDEA-d10을 적용하였습니다. 그 결과, 17종 성분 모두 다른 방해 물질의 영향 없이, 상대 표준편차 5% 미만의 안정적인 재현성을 결과에서 확인할 수 있습니다.

표 5. 반복분석을 통한 재현성 평가.

성분명	적용된 내부표준품	상대표준편차 (RSD, %)
NDELA	NDMA-d6	3.5
NDMA	NDMA-d6	1.8
NDiNA	NDEA-d10	3.1
NMOR	NDEA-d10	4.0
NMBA	NDEA-d10	1.6
NPYR	NDMA-d6	1.3
NMEA	NDMA-d6	3.3
NDEA	NDEA-d10	3.2
NPIP	NDEA-d10	2.8
EIPNA	NDEA-d10	3.2
NDiPA	NDEA-d10	2.5
NDPA	NDEA-d10	1.9
NMPhA	NDEA-d10	3.6
NEPhA	NDEA-d10	2.0
NDBA	NDEA-d10	1.5
NDiBA	NDEA-d10	2.7
NDBzA	NDEA-d10	2.5

정량 결과 확인 및 회수율 평가

샘플로 사용된 고무풍선은 용출반응 및 니트로화 반응을 거쳐 정량분석에 사용되었습니다. 분석법에 대한 정확도를 평가하기 위해, 용출반응이 끝난 시험용액에 니트로사민 17종 중간혼합표준용액을 10ppb가 되도록 첨가하여 회수율을 계산하였습니다. 니트로사민 16종은 첨가한 10ppb에 대하여 회수율을 계산했고, NDiNA 화합물은 측정전에 메탄올로 검정표준용액과 시험용액을 1:1 (v/v)로 희석한 뒤 기기 분석에 사용하였으므로 5ppb에 대하여 회수율을 계산하였습니다.

표 6. 고무풍선 중 니트로사민 17성분 정량 결과 및 회수율 결과.

성분명	니트로사민류 정량 결과 (ng/mL)	니트로사민류 생성 가능물질 정량 결과 (ng/mL)	회수율 (%)
NDELA	-	-	88.0
NDMA	-	13.18	90.2
NMOR	-	-	86.0
NMBA	-	-	91.8
NMEA	-	80.56	90.6
NPYR	-	-	87.4
NDEA	-	-	100.3
NPIP	-	-	81.1
EIPNA	-	-	89.8
NDPA	-	-	88.9
NMPhA	0.11	0.30	89.4
NDiPA	-	-	80.9
NEPhA	-	-	90.9
NDBA	-	-	81.1
NDiBA	-	3.13	81.3
NDBzA	0.20	0.96	86.2
NDiNA	-	-	133.8

정량 결과 고무풍선에서 NMPhA와 NDBzA가 각각 0.11ppb, 0.20ppb 수준으로 검출되었으나, 검량선 이하의 농도임을 확인할 수 있습니다. 니트로화 반응결과 니트로사민류 생성 가능물질은 5종이 검출되었고, 이 중 NMEA는 검량선을 초과하는 범위로 검출되었습니다. 고무풍선에서 검출된 니트로사민류 및 니트로사민류 생성 가능물질의 총 함량은 각각 0.003mg/kg과 0.98mg/kg으로 계산되어집니다. 이는 국내 및 국외에서 규정된 안전기준치인 0.05mg/kg, 1mg/kg 과 비교했을 때 모두 허용범위 이내임을 확인할 수 있습니다. 또한 성분 별 회수율의 범위는 80% ~ 134% 수준으로 확인할 수 있습니다.

결론 및 고찰

어린이 제품으로부터 용출되는 니트로사민류 및 니트로사민류 생성 가능물질 17종에 대한 분석이 수행되었습니다. 본 분석을 통해 니트로사민 17종에 대하여 선형성, 정밀성, 정확성을 확인함으로써 분석 가능성을 제시할 수 있으며, 분석 조건은 분석의 정확도 및 정밀도가 확인되는 경우, 사용되는 분석 기기 및 분석물질 등에 따라서 변경될 수 있습니다.

한국애질런트에서는 국내 어린이 제품 공통안전기준에 따라 규제 및 관리하는 7종의 니트로사민을 포함하여, 더 많은 니트로사민을 본 실험에 적용함으로써, 국·내외의 규제기준을 만족하는 분석법을 설정하고, 향후 규제 가능성이 있는 다양한 물질에 대한 분석 가능성도 함께 제시하고자 하였습니다.

본 실험에서는 LCMS 등급의 시약 및 용매를 사용하였고, 안정적인 상태의 표준품을 사용하였습니다. 만약 사용하는 시약, 용매 등급 및 표준품의 상태가 다를 경우에는 이에 따른 결과의 차이가 발생할 수 있습니다.

참고 문헌

1. EN71-12:2016 Safety of toys N-Nitrosamines and N-Nitrosatable substances.
2. 안전확인 안전기준 부속서 6(완구) 제12부 니트로사민류 및 니트로사민류 생성 가능물질.
3. Se-Jong, Park., Mi-Jin, Jeong., So-Ra, Park., Jae Chun, Choi., Heeju, Choi., & MeeKyung, Kim. (2018). Release of N-nitrosamines and N-nitrosatable substances from baby bottle teats and rubber kitchen tools in Korea. Food Sci Biotechnol, 27(5): 1519–1524.

www.agilent.com

DE16792003

이 정보는 사전 고지 없이 변경될 수 있습니다.

©Agilent Technologies, Inc. 2022
2022년 8월 11일, 한국에서 발행
5994-5060KOKR

한국에질런트테크놀로지스(주)
대한민국 서울특별시 서초구 강남대로 369,
A+ 에셋타워 9층, 06621
전화: 82-80-004-5090 (고객지원센터)
팩스: 82-2-3452-2451
이메일: korea-inquiry_lsca@agilent.com

