

Establishment for analytical method of methanol in wet wipes by headspace gas chromatography

Yongkyu Choi, Eunji Baek, Chungsik Min, Rheeda Lee, Soonyoung Park, Jaehyung Ahn,
Sangseop Kim, Seonghwa Hong and Younglim Kim[★]

*Cosmetics Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation,
Osong Health Technology Administration Complex, 187, Osongsaengmyeong 2ro Osong-eup,
Heungdeok-gu, Cheongju-si, Chungcheongbuk-do 28159, Korea*

(Received May 2, 2016; Revised August 19, 2016; Accepted August 19, 2016)

가스크로마토그래프-헤드스페이스를 이용한 물휴지 중 메탄올 정량법 확립 연구

최용규 · 백은지 · 민총식 · 이이다 · 박순영 · 안재형 · 김상섭 · 홍성화 · 김영림[★]

식품의약품안전평가원 화장품연구팀

(2016. 5. 2. 접수, 2016. 8. 19. 수정, 2016. 8. 19. 승인)

Abstract: This research aims to set up and validate methods of analyzing the methanol in wet wipes and verifies the analysis methods that applied to the wet wipes. We used Headspace (HS) Gas Chromatography (GC) - Flame Ionization Detector (FID) to the establish analysis method of methanol in wet wipes and optimized heating temperature, heating time, GC conditions with column. The result indicated that 3 mL of sample in 20 mL headspace vial can be equilibrated efficiently in headspace sampler at 70 °C for 10 min and sample was measured by GC with split injection mode(10:1). The results show that linearity from 1 to 100 ppm was over R² 0.9995, precision was RSD 1.83 % and accuracy(recovery rate) was 105.44 (±1.05 %) on water matrix and wet wipes matrix removed non-woven fabric. Also, monitoring results of total 20 cosmetics on the market, from 0.00017 to 0.00156 % of methanol was detected from wet wipes.

요 약: 본 연구는 물휴지 중 메탄올 정량법을 확립 및 밸리데이션을 수행하고, 확립된 시험법을 인체세 정용 물휴지에 적용하여 검증하는 것을 목적으로 하였다. 물휴지 중 메탄올 정량시험은 헤드스페이스/가스크로마토그래피/불꽃이온화검출기법(HS/GC/FID)을 사용하였고, '의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인'에 따라 밸리데이션을 수행하였다. 확립된 시험법에서 메탄올의 정량범위는 3~40 µg/mL로 나타났으며, 상관계수(R²) 0.999 이상의 직선성과 우수한 선택성을 나타내었고, 검출한계와 정량한계는 각각 0.36와 1.17 µg/mL로 나타났다. 검출범위 내 농도별 회수율을 시험한 결과는 100.67~110.17 %를 나타냈다. 정밀성시험 결과 메탄올 검출량의 상대표준편차(RSD %)는 1.83 %로 2 % 이내의 결과를 나타

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)43-719-4851 Fax : +82-(0)43-719-4850

E-mail : monikak@korea.kr

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

났다. 물휴지 중 메탄올 시험법을 유통 중인 물휴지 20개 제품에 적용하여 검출량을 분석한 결과 20개 제품에서 0.00017%~0.00156%로 나타나 검출허용한도 기준 내 적합한 것을 확인하였다.

Key words: cosmetic, methanol, wet wipes, headspace gas chromatography

1. 서 론

메탄올(methanol)은 메틸알코올(methyl alcohol), 우드알코올(wood alcohol)등으로도 불리는 물질로 무색의 액체로서 에탄올과 비슷한 성질을 가지는 유기용매이다. 동물, 식물 등에 자연적으로 존재하며 주로 화학물질의 합성 및 추출, 다양한 산업용품의 원료 등으로 사용되고 있으며 부동액, 향수, 포름알데히드 용액, 기타 알코올 용액 등에 주로 포함되어있다.^{1,2} 메탄올은 체내 흡수 시 포름알데하이드(formaldehyde), 포름산(formic acid)으로 대사되는데, 이는 메탄올보다 더 강한 독성을 가지며 산성 혈액증 및 간의 산화를 유발한다. 때문에 인간이 메탄올에 노출될 경우 중추신경계 손상, 두통, 현기증, 구토, 행동이상 등이 발생하고, 피부 접촉시 피부건조화, 피부자극을 유발하며 다량 경구 섭취시 시력손상과 사망을 일으킬 수 있다.^{3,4} 이에 우리나라에서는 메탄올을 화장품에 사용할 수 없는 배합금지 성분으로 지정하고 있으며, 에탄올을 원료로 사용시 메탄올이 불순물로 미량 잔존하는 경우를 위해 ‘화장품 안전기준 등에 관한 규정’을 통해 화장품 중 메탄올을 0.2%로 검출허용한도를 지정하여 관리하고 있다.^{5,6}

2015년 화장품법 시행규칙이 일부 개정되어, 그간 공산품으로 분류되어 관리되고 있던 인체세정용 물휴지가 화장품으로 전환되었으며, 인체세정용 물휴지 중 메탄올의 검출허용한도 기준은 종전의 공산품의 규정에 따라 0.002%이하가 적용되었다. 현재 유통화장품 안전관리기준에서 제공하고 있는 화장품 중 메탄올 시험법은 물휴지를 제외한 화장품 모든 유형의 검출허용한도 기준인 0.2% 이하에 적용 가능한 분석법으로 물휴지의 검출허용한도 기준 0.002%에 적용하기에 어려움이 있다.

따라서 본 연구에서는 전처리 없이 부직포를 제외한 물휴지액에서 더 낮은 농도의 메탄올을 직접

분석하기 위하여 Headspace Gas Chromatography - Flame Ionization Detector (HS/GC/FID)를 이용한 분석방법을 연구하였다. 물휴지 중 메탄올 정량법 확립을 위해 기존의 ‘화장품 안전기준 등에 관한 규정’ 중 메탄올 시험법과 ‘KS M ISO 11423-1 수질-벤젠 및 그 유도체 측정방법(제1부: 헤드스페이스 가스크로마토그래프법)’을 검토하였다. 또한 HS/GC/FID를 이용하여 ‘의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인’에 따라 유효성 확인을 실시하여 물휴지 중 메탄올의 효율적인 정량법을 확립하고자 하였다.⁷⁻¹⁰

2. 실험

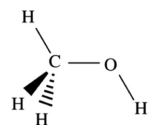
2.1. 시료 및 시약

본 연구에서 사용한 메탄올 표준품 (Methanol, Cat. No 322415, 순도 99.8%)은 Sigmaaldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하여 사용하였다. 표준용액은 HPLC급 시약 물 (Merck, Darmstadt, Germany)을 사용하여 조제하였으며, 메탄올의 물리 화학적 특징은 Table 1에 나타내었다. 메탄올 검출수준을 파악하기 위해 유통되고있는 인체세정용 물휴지 20종은 브랜드숍 등을 통해 구입하였다.

2.2. 표준용액의 제조

메탄올 표준품 약 1 mL을 정확하게 취하여 물

Table 1. Physicochemical properties of methanol

IUPAC name	Methanol
CAS. No	67-56-1
Molecular weight	32.04 g/mol (CH ₃ OH)
Melting point	-97 °C (-143.7°F, 175.6K) ⁻³
Boiling point	64.7 °C (148.5°F, 337.8K)
Density	0.792 g.cm ⁻³
Structure	

을 넣어 정확하게 1.0 L로 하여 표준원액으로 조제하였으며, 표준원액을 0.3 mL, 0.5 mL, 1 mL, 2 mL, 4 mL씩 정확하게 취하여 물을 넣어 100 mL로 한 액을 각각의 표준액으로 하여 검량곡선 작성에 사용하였다. 제조한 모든 표준용액은 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2.3. 시료 전처리

정확성, 정밀성 검증 및 유통되고 있는 인체세정용 물휴지의 메탄올 검출량 확인을 위해 국내에서 유통되고 있는 물휴지를 사용하였다. 부직포와 물휴지액이 함께 포함되어있는 물휴지에서 부직포를 제외한 물휴지액만을 추출하여 다른 전처리 없이 시료로 사용하였다. 남은 물휴지액은 밀봉하여 4 °C에 보관하였다.

2.4. 기기 분석 조건

메탄올 검출량은 FID 검출기 (flame ionization detector)가 장착된 헤드스페이스-가스크로마토그래프(HS-20/GC-2010 plus, Shimadzu, Kyoto, Japan)

Table 2. Headspace parameter for the analysis of methanol

Headspace	HS-20
Total vial Volume	20 mL
Injection Volume	1 mL
Oven Temperature	70 °C
Sample Line Temperature	80 °C
Transfer Line Temperature	90 °C
Equilibrating Time	10 min
Pressurizing Time	0.5 min
Load Time	0.5 min
Load Equilibrate Time	0.1 min
Injection Time	0.5 min

Table 3. HS-GC-FID parameter for the analysis of methanol

Instrument	GC-2010
Column	DB-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm)
Oven Temperature	50 °C (5 min) - 10 °C/min - 150 °C (2 min)
Injection Temperature	200 °C
Detector Temperature	240 °C
Injection Volume	1 mL/min
Carrier Gas	N
Split Ratio	10:1
Detector	FID

를 사용하였다. 헤드스페이스용 바이알(volume 20 mL, O.D × H 22.5 mm × 75.5 mm), 캡(septum thickness 1.3 mm)은 각각의 규격을 사용하였다. 분리조건으로는 DB-WAX (30 m × 0.32 mm × 0.5 μm) 칼럼을 사용하였으며, 오븐 온도는 50 °C로 5 분간 유지 후 10 °C/분으로 150 °C까지 온도를 올린 뒤 2분간 유지하였다. 검체주입구 온도는 200 °C 검출기 온도는 240 °C, 주입모드는 split 모드를 사용하였으며 캐리어가스는 질소를 이용하여 유량 1 mL/분으로 하여 측정하였다.

메탄올 시험법은 먼저 헤드스페이스 조건을 확립하기 위해서 표준용액을 사용하여 헤드스페이스 바이알 내 시료 부피(3 mL, 6 mL, 10 mL), 분석 split 비율(10:1, 15:1, 20:1) 변화에 따른 메탄올 검출량의 차이를 확인하였다. 각 세부 분석 조건은 Table 2와 Table 3에 나타났다.

2.5. 분석법 검증

최종적으로 메탄올 표준액을 이용하여 확립된 물휴지중 메탄올 분석법은 '의약품 등 시험방법 밸리데이션에 대한 가이드라인'에 따라 선택성,

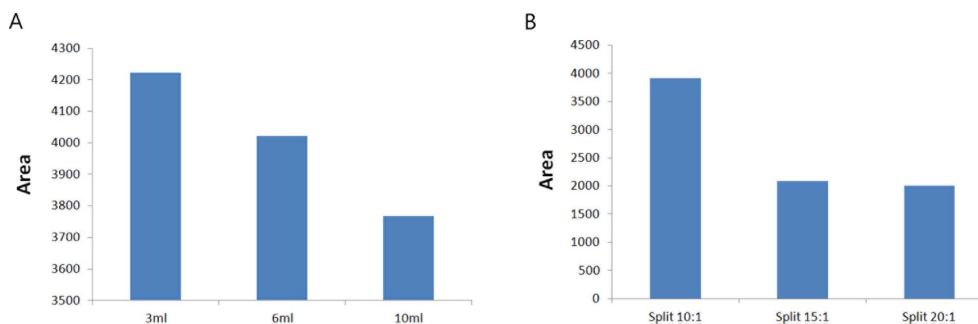


Fig. 1. Methanol peak area by different sample volume (A) and split ratio (B).

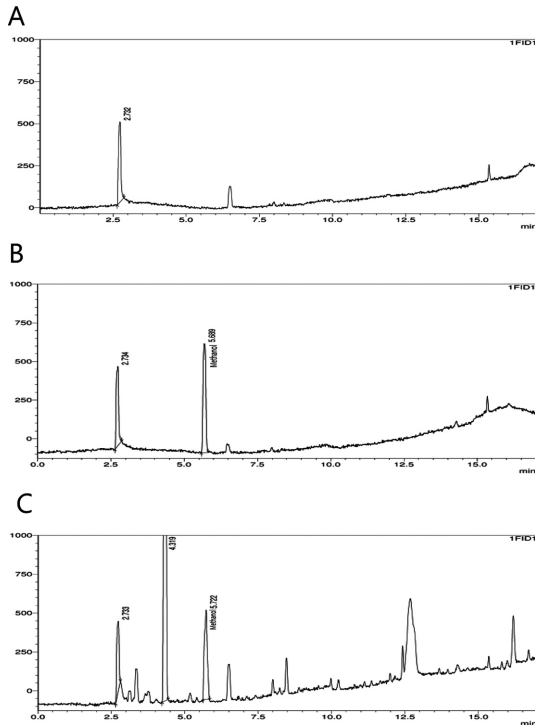


Fig. 2. Comparison result of chromatogram for water (A), methanol standard (B) and wet wipes matrix (C).

시스템적합성, 직선성, 검출한계(LOD), 정량한계(LOQ), 정확성(회수율), 정밀성 등으로 유효성 확인을 실시하였다.

메탄올 표준액을 이용하여 3-40 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에 대한 피크 면적을 이용하여 검량곡선을 작성하여 직선성을 분석하였고 상관계수 r^2 (coefficient of correlation, r^2)를 구하였다. 검출한계 및 정량한계는 각각 메탄올 표준용액을 반복 측정하여 나온 농도값의 표준편차의 3 배와 10 배로 계산하였으며, 물휴지액을 이용하여 물휴지액의 메탄올 회수율과 10 ppm 농도 6반복 실험을 통해 정확성과 정밀성을 확인하였다. 또한 유통되고 있는 인체세정용 물휴지 20 종을 통해 메탄올 검출량을 확인하였다.

Table 4. Results of Equation, LOD and LOQ for methanol analysis

Concentration range ($\mu\text{g/mL}$)	Linearity	r^2	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
3 - 40	$y = 469.49x + 127.21$	0.9995	0.36	1.19

Table 5. Results of system precision for methanol analysis

	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Analysis conc. ($\mu\text{g/mL}$)
1	10	9.93
2	10	10.08
3	10	10.01
4	10	10.09
5	10	10.00
6	10	10.11
Average	-	10.03
St.dev	-	0.07
RSD(%)	-	0.66

3. 결 과

3.1. 분석조건 확립

메탄올을 분석하기 위한 조건으로 먼저 10 ppm의 메탄올 표준액을 기준으로 하여 헤드스페이스 바이알의 시료부피를 설정하여 각 피크의 머무름시간과 피크면적을 확인한 결과, 시료의 부피가 증가할수록 피크 면적은 점점 더 감소하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 또한 split 비율에 따른 각 피크의 머무름시간과 피크면적을 분석한 결과 split 비율에 따라 피크 면적이 차이를 보였다(Fig. 1B). 즉, 3 mL의 시료를 취하여 split 비율 10:1 수준으로 분석할 경우 가장 높은 intensity를 나타내었으므로, 본 연구에서는 20 mL 헤드스페이스 바이알에 시료량 3 mL, split 비율 10:1을 적용하여 시험을 진행하였다.

3.2. 분석조건의 유효성 확인

본 연구의 분석조건에 대한 유효성 확인을 위해 먼저 물용매, 메탄올 표준액, 물휴지액을 대상으로 한 공시험 분석 결과, Fig. 2에서와 같이 크로마토그램에서 메탄올의 머무름 시간대와 동일한 머무름 시간을 갖는 방해물질이 존재하지 않는 것을 확인하였다. 또한 Table 4~Table 5와 같이 검정곡선 측정범위 3~40 ($\mu\text{g/mL}$)에서 메탄올

Table 6. Results of recovery for methanol analysis in wet wipes

Spiked conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Methanol (n=3)				
	Analysis conc.	Recovery (%)	Average conc.(%)	St.dev	RSD (%)
5	5.47	109.33	110.17	0.0422	0.77
	5.55	111.02			
	5.51	110.17			
10	10.56	105.59	105.80	0.0606	0.57
	10.53	105.32			
	10.65	106.48			
20	20.40	101.99	100.36	0.3644	1.82
	19.68	98.39			
	20.14	100.69			

Table 7. Results of precision for methanol analysis in wet wipes

	Spiking conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Analysis conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)
1	10	10.56	105.59
2	10	10.53	105.32
3	10	10.65	106.48
4	10	10.45	104.52
5	10	10.28	102.78
6	10	10.14	101.39
Average	-	10.43	-
St.dev	-	0.17	-
RSD(%)	-	1.83	-

에 대한 상관계수(r^2)가 0.999 이상으로 우수한 직선성을 나타냈고 6회 반복실험을 통한 적합성 결과 상대표준편차 0.66%으로 기준 1.0%이하의 통계적으로 유의한 결과를 나타냈다. 또한 메탄올 표준용액을 반복 측정하여 나온 농도값의 표준편차의 3 배를 검출한계(LOD), 10 배를 정량한계(LOQ)로 하였을 때 각각 LOD 0.3 (6 $\mu\text{g/mL}$), LOQ 1.19 ($\mu\text{g/mL}$)로 나타났다. 분석법의 정확성을 평가하기 위해 물휴지액에 메탄올 농도를 검량곡선 범위 내 3가지 농도(5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$)가 되도록 전처리 하였을 때, 회수율은 100.36%~110.17%의 결과를 나타내었다(Table 6). 또한 정밀성을 평가하기 위해 10 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 6회 반복하여 물휴지에 전처리 하였을 때, 상대표준편차 1.83%로 통계적으로 유의한 수준의 정밀도를 나타내었다. 따라서 위와 같은 유효성 확인을 통

Table 8. Monitoring results of methanol for cosmetic on the market

Sample number	Analysis conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Analysis result (%)
1	7.36	0.00074
2	4.39	0.00044
3	4.00	0.00040
4	5.43	0.00054
5	5.72	0.00057
6	10.85	0.00108
7	6.68	0.00067
8	3.78	0.00038
9	8.12	0.00081
10	2.69	0.00027
11	1.67	0.00017
12	10.14	0.00101
13	6.18	0.00062
14	2.24	0.00022
15	15.65	0.00156
16	9.26	0.00093
17	7.15	0.00071
18	5.74	0.00057
19	2.60	0.00026
20	4.60	0.00046
Average	6.213	0.001

해 화장품 중 물휴지 시료에서 메탄올의 분석방법으로 적합함을 확인하였다.

3.3. 시중 유통 화장품에 대한 확인시험

확립된 물휴지 중 메탄올 정량법에 따라 유통되고 있는 인체세정용 물휴지 20종을 대상으로

메탄올 검출수준을 파악한 결과, 0.00017%~0.00156%로 물휴지 관리기준인 검출 허용한도 0.002% 이내 수준임을 확인하였다(Table 8).

4. 고 찰

2015년 화장품법 시행규칙이 일부 개정되어 그간 공산품으로 분류되어 관리되고 있던 인체 청결용 물휴지가 화장품으로 전환되었으며, 인체세정용 물휴지 중 메탄올의 검출허용한도 기준은 종전의 공산품의 규정에 따라 0.002% 이하가 적용되었다. 현재 유통화장품 안전관리 기준에서 제공하고 있는 화장품 중 메탄올 시험법은 물휴지를 제외한 화장품 모든 유형의 검출허용한도 기준인 0.2% 이하에 적용 가능한 분석법으로 물휴지의 검출허용한도 기준 0.002%에 적용하기에는 어려움이 있었다. 이에 물휴지 중 메탄올을 정량할 수 있는 시험법의 확립이 필요하여, 헤드스페이스를 이용한 물휴지 중 메탄올 시험법을 개발하고자 하였다. 분석법 확립에 사용한 시료는 유통되고있는 인체세정용 물휴지를 이용하였으며, 헤드스페이스 바이알 내 시료량과 split 비율에 따른 메탄올 검출 감도를 고려하여 20 mL 헤드스페이스 바이알에 시료량 3 mL, split 비율 10:1로 선정하여 시험법을 확립하였다. 확립된 시험법의 유효성 확인을 수행하였으며, 메탄올의 검량곡선은 상관계수(r^2)가 0.999 이상의 우수한 직선성을 나타내었고 회수율과 정밀성은 각각 평균 105.44%, 상대표준편차 1.83%를 나타내었다. 또한 유통되고있는 인체세정용 물휴지 20제품을 대상으로 확립된 시험법을 적용한 결과 0.00017~0.00156%로 검출허용한도 0.002% 이내의 메탄올 검출수준을 확인할 수 있었다. 따라서 확립된 물휴지 중 메탄올 정량법은 ‘화장품 안전기준 등에 관한 규정 개정(안)’으로 마련되어 물휴지의 품질 관리 및 사후관리에 활용 되고 있으며, 유통화장품 안전관리에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 과제번호 ‘15171화장품213’의 연구사업비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. D. Jacobsen and K. E. McMartin, Methanol and ethylene glycol poisonings. Mechanism of toxicity, clinical course, diagnosis and treatment. *Med. Toxicol.*, **1**, 309-334 (1986).
2. R. j. Meyer, M. E. Beard and M. W. Ardagh, Henderson S. Methanol poisoning. *N. Z. Med. J.*, **113**, 11-13 (2000).
3. P. A. Stafford and C. S. Ough, Formation of methanol and ethyl methyl carbonate by dimethyl dicarbonate in wine and model solutions. *Am. J. Enol Vitic.*, **27**, 7-11 (1976).
4. C. E. Becker, Methanol poisoning. *J. Emerg. Med.*, **1**, 51-58 (1983).
5. A. Turla, N. Yayci and S. Koc, Olumle sonuclanan metil alkol Zehirlenmeleri. *Adli Typ Derg.*, **15**, 37-44 (2001).
6. Regulations on the Safety Standard, etc. of Cosmetics (Ministry of Food and Drug Safety, 2013-24, 2013).
7. Standards and Test Methods of Functional Cosmetics (Ministry of Food and Drug Safety, 2013-28, 2013).
8. Guideline for analysis method of restricted (prohibited) ingredients of cosmetics (Ministry of Food and Drug Safety, B2-2013-4-002, 2013).
9. Guideline for the validation of drug analysis procedure (Ministry of Food and Drug Safety, B1-2012-2-013, 2012).
10. Self-Regulatory Safety Confirmation (industrial product) Annex 49 Wet wipes (Ministry of Food and Drug Safety).
11. ISO 11423-1 Water quality-Determination of benzene and some derivatives (Part1: Head-space gas chromatographic method).