

**어린이 용품 함유 비스페놀 A -
액체크로마토그래피/형광검출법(경피노출)**
(Determination of release of bisphenol A
in sweat simulant from toys and childcare articles - Liquid
chromatograph/Fluorescence)

2014

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 어린이 용품에 함유되어 있는 비스페놀 A가 노출경로 중 경피노출에 의해 전이되는 농도를 측정하기 위한 방법이다. 경피노출에 의한 전이는 비스페놀 A를 와류진탕추출기(Head over heel rotator)를 이용하여 인공땀으로 시료를 추출하여 액체 크로마토그래피/형광검출기(Liquid chromatograph/fluorescence detector, LC/FLD)로 정성 및 정량하는 방법이다.

1.2 적용범위

1.2.1 비스페놀 A의 분석방법 검출한계는 $0.02 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 의 값을 만족해야 한다.

1.2.2 이 시험 방법에 따라 시험할 경우 정량한계는 $0.06 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 의 값을 만족해야 한다.

1.3 간섭물질

1.3.1 분석결과에 오류를 가져올 수 있는 주요 오염원으로는 용매, 시약, 유리 기구 및 그 외 분석과정 중에 사용하는 모든 기구 등이다. 이들은 크로마토그램상의 바탕선을 상승시키는 등 시료분석 과정에 영향을 줄 수 있으며, 분석 자료의 질을 저하시킬

수 있다. 따라서 모든 시약은 순도 및 불순물의 종류와 함량을 고려하여 엄선하고 필요한 경우 용매나 시약은 증류 및 정제하여 사용한다. 각 실험실에서는 오염원으로 인한 영향 유무나 수준에 대해 바탕시료(Reagent blank)의 측정을 통한 평가가 필요하다.

1.3.2 시약이나 용매는 특급 이상의 것을 사용하고, 필요한 경우 증류나 정제 과정을 통해 불순물의 방해로 인한 문제를 최소화하도록 한다.

2.0 용어의 정의

2.1 비스페놀 A

분석대상 비스페놀A는 표 1과 같다.

표 1 분석대상 물질

No	국문명	영문명	CAS No.
1	비스페놀 A	Bisphenol A	80-05-7

3.0 분석기기 및 기구

3.1 액체크로마토그래프/형광검출기

3.1.1 컬럼

길이 250 mm, 안지름 4.6 mm, 필름두께 5 μ m의 C₁₈ 컬럼 또는 이와 동등 이상의 분리능을 가진 것이어야 한다.

3.1.2 이동상 : 아세트나이트릴(A), 물(B)

[주 1] A : B(60:40)에서 필요에 따라 적절히 조절한다.

3.1.3 유속 : 1.0 mL/min

3.1.4 온도 : 25 °C

3.1.5 주입량 : 20 µL

3.1.6 검출기 : 형광검출기(Ex : 225, Em : 317 nm)

[주 2] 검출기, 컬럼 등의 조건은 기기 및 분석에 따라 일부 변경될 수 있다.

3.2 전자저울

소수 넷째자리까지 g 단위의 무게를 잴 수 있어야 한다.

3.3 와류진탕추출기

와류진탕추출기(Head over heel rotator)는 250 mL 유리병을 고정할 수 있고, 실험하는 동안 일정한 속도를 유지할 수 있는 것을 사용한다. 유리병의 중심 회전축으로부터 반지름이 150 mm가 되도록 하여 사용한다.

3.4 유리병

250 mL 유리병은 바닥이 편평하고 마개를 닫을 수 있으며, 마개가 PTFE 셉텀(Polytetrafluoroethylene septum)이 있는 것을 사용한다.

3.5 바이알

액체크로마토그래피용 바이알 마개는 테프론(Polytetrafluoroethylene) 재질을 사용한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 정제수

탈이온수(3차 증류수)를 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 비스페놀 A 표준원액(100 mg/L)

비스페놀 A를 메탄올로 희석하여 100 mg/L의 표준용액으로 만들어 사용한다.

[주 2] 이와 동등한 농도로 제조되어 시판되는 표준원액을 사용할 수 있다.

4.2.2 비스페놀 A 표준용액(10 mg/L)

표준 원액을 메탄올로 희석하여 10 mg/L의 희석 표준용액을 제조한다. 표준용액을 단계별로 취하여 5~6개의 표준물질을 준비한다.

4.3 인공땀 용액 (Artificial sweat solution)

약 900 mL의 증류수에 요소 1 ± 0.01 g, 염화나트륨 5 ± 0.01 g, 젖산 940 ± 20 μ L을 녹인다. 희석된 암모니아 용액(1 %)으로 pH 6.5 ± 0.10 이 되도록 조정한다. 용액을 1 L 부피 플라스크에 옮기고, 증류수로 전체량을 1 L로 하여 최종 인공땀 용액의 조성이 표 2.와 같이 되도록 조제한다.

표 2. 인공땀 용액의 조성

물 질	조 성
요소(urea)	0.1 %
염화나트륨(NaCl)	0.5 %
젖산(lactic acid)	0.1 %

4.3.1 요소(Urea, $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, 60.06)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.2 염화나트륨(Sodium chloride, NaCl, 58.44)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.3 젖산(Lactic acid, $C_3H_6O_3$, 90.08)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.4 암모니아 용액(Ammonia, NH_3 , 17.03)

특급 이상의 것을 사용한다.

5.0 시료 준비 및 관리

5.1 시료의 준비

5.1.1 시료의 두께가 (1 ~ 2) mm 이내로 가능한 편평한 부분을 선택하여 앞, 뒤 면 적 합이 약 10 cm^2 이상 넓이가 되도록 시편을 만든다.

[주 4] 시료의 두께가 (1 ~ 2) mm 이상일 경우 옆면의 표면적을 측정하고 기록해 둔다.

5.1.2 각 시료별 고유번호 또는 시료명 등 정보를 기록하고 상세한 정보는 별도의 기록지에 같이 기록한다.

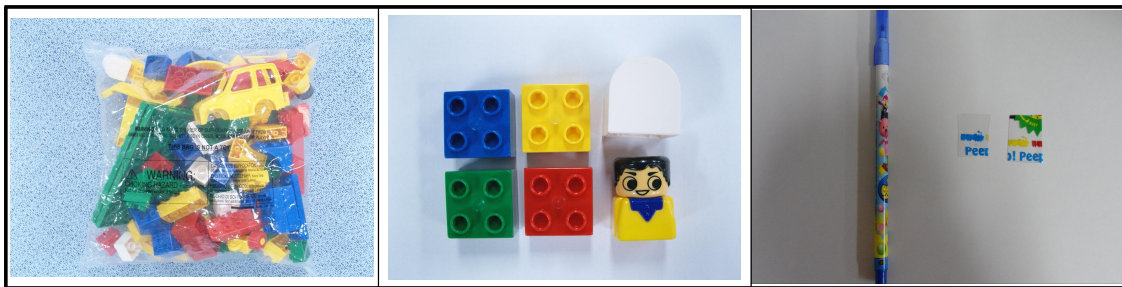


그림 1. 경피 전이량 시료의 준비

6.0 품질보증/품질관리(QA/QC)

6.1 방법검출한계(MDL, Method Detection Limit)

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

6.2 방법바탕시료의 측정

시료군마다 1개의 방법바탕시료를 측정한다. 방법바탕시료는 비스페놀 A가 없는 것으로 확인된 매질을 사용하여 시료와 동일하게 전처리·측정하며 측정값은 방법검출한계 이하 이어야 한다.

6.3 검정곡선의 작성 및 검증

6.3.1 검정곡선의 작성 및 검증은 정량범위 내의 5개 이상 농도에 대해 검정곡선을 작성하고, 얻어진 검정곡선의 결정계수(R^2)가 0.98 이상 또는 감응계수(Response Factor)의 상대표준편차가 15 % 이내이어야 하며 결정계수나 상대표준편차가 허용범위를 벗어나면 재 작성하도록 한다.

6.3.2 검정곡선의 감응계수의 검증은 검정곡선의 중간 농도 값을 갖는 표준용액의 농도를 측정한다. 측정된 농도 값과 표준용액의 농도값 간의 차이가 15 % 이내에서 일치하여야 한다. 만약 이 범위를 넘는 경우, 검정곡선을 재 작성한다.

6.4 정확도 관리

6.4.1 유사한 매질의 인증표준물질 (CRM, Certified Reference Material) 또는 이에 상응하는 표준물질을 사용하여 시료와 동일한 방법으로 전처리 및 분석하여, 4회 이상 반복한 평균 회수율이 인증값 범위 또는 (70 ~ 130) % 내에 있어야 한다.

6.4.2 모든 시험에서 바탕시험을 실시하여 시료 측정결과를 보정해 주어야 한다.

6.5 내부정도관리 주기

6.5.1 방법검출한계, 정량한계, 정확도는 연 1회 이상 산정하는 것을 원칙으로 하며, 분석자의 교체, 분석 장비의 수리 및 이동 등의 주요 변동사항이 생길 경우에는 다시

실시한다. 단, 장비의 청소 및 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인하여야 한다.

6.5.2 검정곡선 검증은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에는 방법바탕시료를 측정하여 오염여부를 점검한다.

7.0 분석절차

7.1. 전처리

7.1.1 미리 잘라둔 시료를 250ml 유리병에 옮긴 후 50ml 인공땀을 첨가한다.

[주 6] 인공땀 용액은 사용하기 전 37 °C 온도로 유지되어야 한다.

7.1.2 항온 건조기에 유리병을 넣고 37 °C, 7시간 45분을 방치한다. 추출이 끝나면 상온까지 냉각하고 사용하여 2 mL 추출액을 취해 2 mL 바이얼에 넣은 다음 내부표준 물질을 첨가하여 시험용액으로 한다.

7.2 측정 방법

7.2.1 시험 용액 20 µL을 액체크로마토그래프에 주입한다. 따로 비스페놀 A 표준용액에 대하여 동일 조건에서 액체크로마토그래프를 행한다. 표준물질의 피크 면적으로부터 검정곡선을 작성하여 절대검정곡선법으로 정량한다.

7.2.2 전처리한 시료는 (4 ± 2) °C의 어두운 곳에 보관할 때 3주 동안 안정성이 보장되어야 한다.

7.3 시료분석결과

7.3.1 정성분석

7.3.1.1 각 분석물질 별 두 개의 선택 이온이 정해진 머무름 시간에서 나타나야 한다.

7.3.1.2 각 분석물질들을 검출하기 위해서 크로마토그램 피크에 대한 신호 대 잡신호 비(S/N, signal/noise)는 2.5보다 커야한다.

7.3.2 정량분석

7.3.2.1 절대검정곡선법

7.3.2.1.1 비스페놀 A 표준 용액에 대하여 최소 5점 이상의 농도를 선택하여 검정곡선을 작성한다. 검정곡선으로부터 표준물의 농도에 대한 기기 감도(피크의 면적 또는 높이)의 선형회귀 분석을 얻을 수 있다. 이 회귀 분석은 다음 식과 같이 기울기와 절편으로 된 선형식을 사용한다.

$$y = ax + b \quad (\text{식 1})$$

y : 기기감도 (피크의 면적 또는 높이)

a : 검정곡선의 기울기

x : 표준물질의 농도

b : 검정곡선의 절편

7.3.2.1.2 위의 선형회귀식으로 구한 분석물질의 농도에 공시험결과를 제하고 아래 (식 2)에 따라 환산하여 시료 중 분석물질의 농도를 결과로 한다.

$$C_M(\mu g/cm^2 \cdot m) = \frac{C_S(\mu g/mL) \times \text{최종액량}(mL)}{A(cm^2) \times T(mi)} \times F \quad (\text{식 2})$$

C_S : 검정곡선에 의한 비스페놀 A의 농도

C_M : 시편의 단위 면적당 용출시간 당 비스페놀 A의 전이농도(μg/cm²/min)

A : 시편 면적 (cm²)

T : 용출시간 (min)

F : 농축단계 계수(Fact for concentration step)

7.3.2.1.3 만약 시료 중 대상물질의 농도가 검정곡선의 정량범위를 넘어갈 경우, 시료를 묽혀서 정량 범위 내에 들어오도록 농도를 조절해야 한다. 이때 희석에 의한 대상물질의 농도와 검출한계 등은 조절되어야 한다.

8.0 결과 보고

8.1 분석결과 보고

8.1.1 시료채취관련 자료

시료목록, 시료번호, 시료채취 일자 등을 보고한다.

8.1.2 분석방법 자료

분석일자, 시료량, 추출과정, 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 크로마토그램을 분석시료의 크로마토그램과 함께 보고한다.

8.1.3.2 방법검출한계, 방법정량한계 및 산출근거를 보고한다.

8.1.3.3 분석결과 농도를 보고한다.

8.2 결과의 표시

8.2.1 농도 측정 결과는 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 으로 표기하며 유효숫자 넷째자리까지 구하고 반올림하여, 결과는 셋째자리로 표시한다.

8.2.2 모든 농도결과는 정량한계를 적용하여 나타내고 정량한계 미만은 불검출로 표시하며 정량한계 값을 같이 제시한다.

9.0 참고자료

9.1 European Committee For Standardization, EN 71 "Safety of toys" part 10 :
Organic chemical compounds - Sample preparation and extraction, 2005

9.2 European Committee For Standardization, EN 71 "Safety of toys" part 11 :
Organic chemical compounds - Methods of analysis, 2005

9.3 국립환경과학원, 어린이용품의 노출평가 시험방법(I), 2009

9.4 DEPA, Survey and Health Assessment of the exposure of 2 year-olds to
chemical substances in Consumer Products, 2009

10.0 부록

1. 시료준비	2. 항온 방치
	
3. 2ml vial	4. LC/DAD 분석
	

그림 2. 어린이 용품의 비스페놀A 전이량 분석 절차

표 3. 정도관리 목표값

정도관리 항목	정도관리 목표
방법검출한계	0.02 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
정량한계	0.06 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
검정곡선의 직선성	결정계수 0.98 이상
바탕시료	정량한계 미만
정밀도	20 %

표 4. 비스페놀 A 분석을 위한 액체크로마토그래피/형광검출기 조건

기기분석 조건		
액체크로마토그래피	컬럼	Waters Sunfire™ C ₁₈ (3.5 μm , 4.6×150 mm)
	이동상	A : acetonitrile, B : water A : B = 60:40, isocratic mode
	유량	1 mL/min
	오븐 온도	25 °C
	주입량	20 μL
	선택 파장	Ex = 225 nm, Em = 317 nm

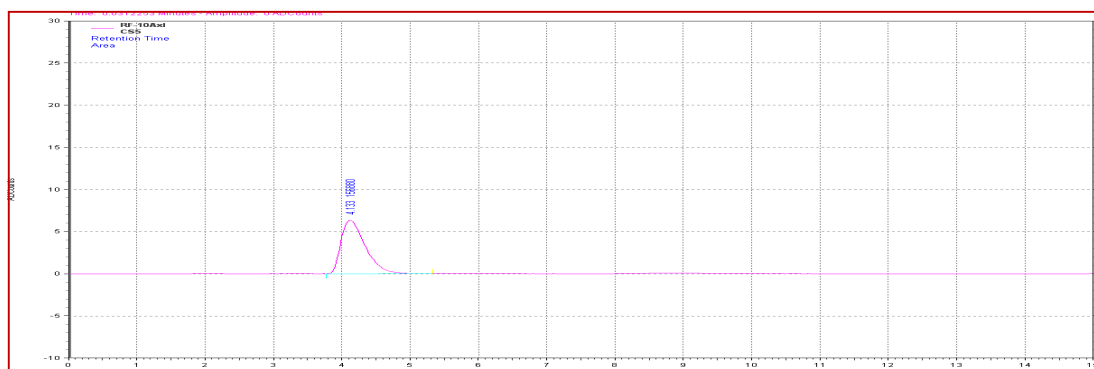


그림 3. 비스페놀 A 표준용액 분석 크로마토그램

표 5. 시료 분석결과보고 양식(예시)

어린이 용품 중 비스페놀 A 분석결과

시료번호		11-I-12-Y
제품명		○○○
원산지		한국
제조사 / 판매사		○○○ / ○○○
제조년월		2014. 1.
제품 바코드		0 000000 000000
KC 마크	표시여부	○
	확인기관	○○○
	신고필증번호	00000000-00000-00
제품 재질		○○○
시료조제사진		
본체	부분시료	분쇄 후
		

<붙임>

1. 분석크로마토그램
2. 각 분석물질별 농도 결과 표