

어린이 용품 함유 착색제 -

2018

고성능액체크로마토그래피(경구노출) (Determination of release of colorants in saliva simulant from children's products - high performance liquid chromatography/ultraviolet-visible spectrometry)

1.0 개요

1.1 목적

이 시험방법은 어린이 용품에 함유되어 있는 착색제가 노출경로 중 빠는 행위 (mouthing)에 의해 전이되는 농도를 측정하기 위한 방법이다. 빠는 행위에 의한 전이는 와류진탕추출기 (head over heel rotator)를 이용하여 인공침으로 시료를 추출한 후 액체크로마토그래피/자외선-가시선 분광법(high performance liquid chromatography/ultraviolet-visible spectrometry, HPLC/UV-Vis)으로 정성 및 정량하는 방법이다.

1.2 적용범위

1.2.1 착색제의 분석방법 검출한계는 $0.006 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 이하의 값을 만족해야 한다.

1.2.2 이 시험 방법에 따라 시험할 경우 정량한계는 $0.018 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$ 이하의 값을 만족해야 한다.

1.3 간섭 물질

1.3.1 분석결과에 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 정제수 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 분석과정 중 시료를 오염시킬 수 있으며 유리표면에 분석물질이 흡착될 경우 목적성분이 손실될 우려가 있으므로 적합한 세척방법을 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 잔류농약분석급 또는 특급 이상의 것을 사용하고, 필요한 경우 증류나 정제 과정을 통해 불순물의 방해로 인한 문제를 최소화하도록 한다.

2.0 용어정의

2.1 착색제

분석대상 착색제는 표 1과 같다.

표 1. 분석대상 착색제 5종

물질	영문명	CAS number
컬러인덱스 disperse orange 3	disperse orange 3, C.I. 11005	730-40-5
컬러인덱스 disperse yellow 3	disperse yellow 3, C.I. 11855	2823-40-8
컬러인덱스 disperse red 1	disperse red 1, C.I. 11110	2872-52-8
컬러인덱스 basic violet 3	basic violet 3, C.I. 42555	548-62-9
컬러인덱스 acid violet 49	acid violet 49, C.I. 42640	1694-09-3

3.0 분석기기 및 기구

3.1 와류진탕 추출기

와류진탕 추출기(head over heel rotator)는 250 mL 유리병을 고정할 수 있고, 실험하

는 동안 일정한 속도를 유지할 수 있는 것을 사용한다. 유리병의 중심 회전축으로부터 반지름이 150 mm가 되도록 하여 사용한다.

3.2 액체크로마토그래피/자외선-가시선 검출기 (HPLC/UV-Vis, high performance liquid chromatography/UV-Vis detector)

3.2.1 컬럼

길이 400 mm ~ 600 mm, 100Å, 5 µm의 C18 컬럼 또는 이와 동등 이상의 분리능을 가진 것이어야 한다.

3.2.2 이동상 : A (acetonitril), B (20mM acetic acid (pH 6.5))

3.2.3 이동상유속 : 0.3 mL/min

3.2.4 온도 : 25 °C

3.2.5 주입량 : 5 µL ~ 50 µL

3.2.6 검출기 : 다이오드 어레이

[주 1] 검출기, 컬럼 등의 조건은 기기 및 분석에 따라 일부 변경될 수 있다.

3.3 전자저울

소수 넷째자리까지 g 단위의 무게를 잴 수 있어야 한다.

4.0 시약 및 표준용액

4.1 시약

4.1.1 정제수

탈이온수 (3차 증류수)를 사용한다.

4.1.2 메탄올 (methanol, CH₃OH, 32.04)

잔류농약 분석급 또는 특급 이상의 것을 사용한다.

4.2 표준용액

4.2.1 착색제 표준원액 (1,000 mg/L)

각 착색제를 메탄올로 희석하여 1,000 mg/L의 표준용액으로 만들어 사용한다.

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

4.2.2 착색제 표준용액 (100 mg/mL)

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

4.3 인공침 용액 (simulated saliva salt solution)

약 900 mL의 증류수에 인산 수소 이포타슘, 탄산 포타슘, 염화 포타슘과 염화소듐을 녹인 다음 염화칼슘과 염화 마그네슘을 첨가하고, 용액을 1 L가 되도록 증류수로 표선을 맞춘다. 희석된 염산용액 (3 M)을 사용하여 pH 6.8이 되도록 조정한다. 인공침 용액의 조성은 다음 표 2와 같다.

표 2. 인공침 용액의 조성

화합물	구조식	mmol/L	mg/L
염화 마그네슘	MgCl ₂	0.82	166.7
염화 칼슘	CaCl ₂	1.0	147.0
인산 수소 이포타슘	K ₂ HPO ₄	3.3	753.1
탄산 포타슘	K ₂ CO ₃	3.8	525.2
염화 소듐	NaCl	5.6	327.3
염화 포타슘	KCl	10.0	745.5

4.3.1 염화칼슘 이수화물 (calcium chloride, dihydrate, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 147.02)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.2 염화마그네슘 육수화물 (magnesium chloride, hexahydrate, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 203.3)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.3 탄산포타슘 (potassium carbonate, K_2CO_3 , 138.2)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.4 염화포타슘 (potassium chloride, KCl , 74.55)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.5 인산포타슘 삼수화물 (potassium phosphate, dibasic, trihydrate, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 228.2)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.6 염화소듐 (sodium chloride, NaCl , 58.44)

특급 이상의 것을 사용한다.

4.3.7 염산 (hydrochloric acid, HCl , 36.46)

시약급 이상의 시판되는 35 % 염산을 3 M 염산용액으로 희석하여 사용한다.

5.0 시료채취 및 관리**5.1 시료의 준비**

5.1.1 페인트 코팅 제품 및 금속류

표면 코팅이나 금속장신구 등과 같은 재질의 시료와 같이 시료의 특성상 균일한 표면적의 시편을 얻을 수 없는 경우에는 일정량의 시료를 채취하고 (약 2 g), 채취한 시료의 가로, 세로, 두께를 별도로 기록하여 표면적을 계산한다.

5.1.2 플라스틱, 종이류 및 기타류

플라스틱이나 종이 및 그 외 기타류 같은 재질의 시료는 시료의 두께가 1 mm ~ 2 mm 이내로 가능한 편평한 부분을 선택하여 앞, 뒤 면적 합이 약 10 cm² 넓이가 되도록 시편을 만든다.

[주 3] 시료의 두께가 1 mm ~ 2 mm 이상일 경우 옆면의 표면적을 측정하고 기록해 둔다.

[주 4] 자른 시편 표면에 입자들이 붙어 있다면 핀셋을 이용하여 증류수와 인공침을 넣은 비커에 수초 동안 행귀서 사용한다.

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

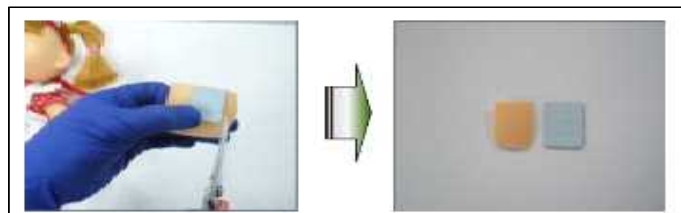


그림 1. 착색제 전이량 시료의 준비

6.0 정도보증/정도관리 (QA/QC)

6.1 방법검출한계 (MDL, method detection limit)

본 분석의 방법검출한계는 착색제가 함유되어 있지 않은 매질에 착색제 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 착색제가 없는 것으로 확인된 매질을 사용하여 시료와 동일하게 전처리·측정하며 측정값은 방법검출한계 이하 이어야 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 이상 또는 교정계수가 $\pm 15\%$ 이내 이어야 하며, 결정계수나 교정계수가 허용범위를 벗어나면 재작성 하도록 한다.

6.3.2 분석 중에 분석대상 시료 20개당 1개 이상의 표준용액 (중간농도)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 $70\% \sim 130\%$ 내에 있어야 한다.

6.4.2 모든 시험에서 정제수 바탕시험을 실시하여 시료 측정결과를 보정해주어야 한다.

6.5 내부정도관리 주기 및 목표

6.5.1 방법검출한계, 정량한계, 정밀도 및 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, 컬럼의 교체 시와 측정 장비의 감도가 의심될 때에는 언제든지 측정하여 확인하여야 한다.

6.5.2 검정곡선 검증 및 시약바탕시료의 분석은 각 시료군마다 실시하며, 고농도의 시료 다음에는 방법바탕시료를 측정하여 오염여부를 점검한다.

6.5.3 정도관리 항목에 대한 정도관리 목표 값은 표 3와 같다.

7.0 분석절차

7.1 시료전처리

7.1.1 미리 잘라둔 시료 10 cm²를 100 mL 인공침 용액이 담긴 250 mL 유리병에 옮겨 담는다.

[주 5] 인공침 용액은 사용하기 전 37℃ 온도로 유지되어야 한다.

7.1.2 와류진탕추출기 (head over heel rotator)안에 유리병을 넣고 고정한 뒤 37 ℃, 60 rpm, 60분의 조건으로 추출한다. 추출이 끝나면 시편은 핀셋을 사용하여 시료용기에서 제거하고 인공침 추출액을 2 ml 바이알에 담아 시험용액으로 한다.

7.2 측정방법

시험 용액 5 μL ~ 50 μL를 액체크로마토그래프에 주입한다. 따로 착색제 표준용액에 대하여 동일 조건에서 액체크로마토그래프로 측정한다. 표준물질의 피크 면적으로부터 검정곡선을 작성하여 절대검량선법으로 정량한다.

7.3 시료분석결과

7.3.1 정성분석

7.3.1.1 두 선택이온의 비가 표준물질의 비와 일치해야하며, 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 절대검량선법

7.3.2.1.1 착색제 표준용액에 대하여 5점 이상의 농도를 선택하여 검정곡선을 작성한다. 검정곡선으로부터 표준물질의 농도에 대한 기기의 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 3)에 따라 환산하여 시료 중 분석물질의 농도를 결과로 한다.

$$C_M (\mu g/cm^2 \cdot min) = \frac{C_s (\mu g/mL) \times \text{최종액량}(mL)}{A (cm^2) \times T (min)} \quad (\text{식 3})$$

여기서, C_s : 검정곡선에 의한 착색제의 농도 ($\mu g/mL$)

C_M : 시편의 단위 면적당, 용출시간당 착색제의 전이농도 ($\mu g/cm^2/min$)

A : 시편 면적 (cm^2)

T : 용출시간 (min)

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

8.0 결과보고

8.1 분석결과 보고

8.1.1 시료채취관련 자료

시료목록, 시료번호, 시료채취 일자 등을 보고한다.

8.1.2 분석방법 자료

분석일자, 시료량, 분해과정, 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 산출근거를 보고한다.

8.2. 결과의 표시

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

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

9.0 참고문헌

9.1 지식경제부 기술표준원, 자율안전확인기준 부속서 36 완구, 2007

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

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

9.4 RIVM report 612810012, Children's Toy Fact Sheet, 2002

10.0 부록

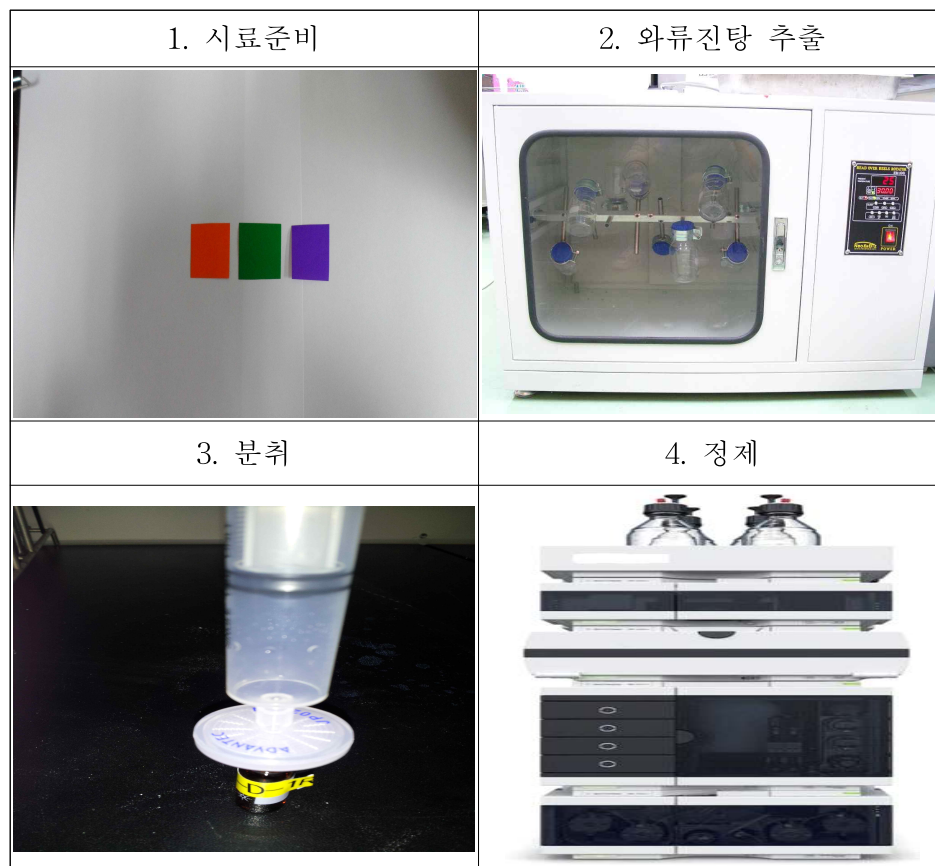


그림 2. 어린이 용품 착색제 전이량 절차

표 3. 정도관리

정도관리 항목	정도관리 목표
검출한계	0.006 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
정량한계	0.018 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{min}$
검정곡선의 직선성 방법바탕시료 정밀도	결정계수 0.99 이상 방법검출한계 미만 15 %

표 4. 액체크로마토그래피/자외선-가시선 분광기 조건 (예시)

구분	기기분석조건	
액체크로마토그래피	컬럼	Xterra MS C ₁₈ (3.5 μm, 2.1×150 mm)
	이동상	A : acetonitrile, B : 20mM acetic acid(pH 6.5) B(%) = 70%(0 min), 70%(2.5 min), 0%(15min), gradient mode
	유량	0.3 mL/min
	오븐 온도	25 ℃
	주입량	10 μL
	선택파장	Basic violet : 600nm, Acid violet 49 : 600nm, Disperse orange 3 : 440nm, Disperse yellow 3 : 360nm

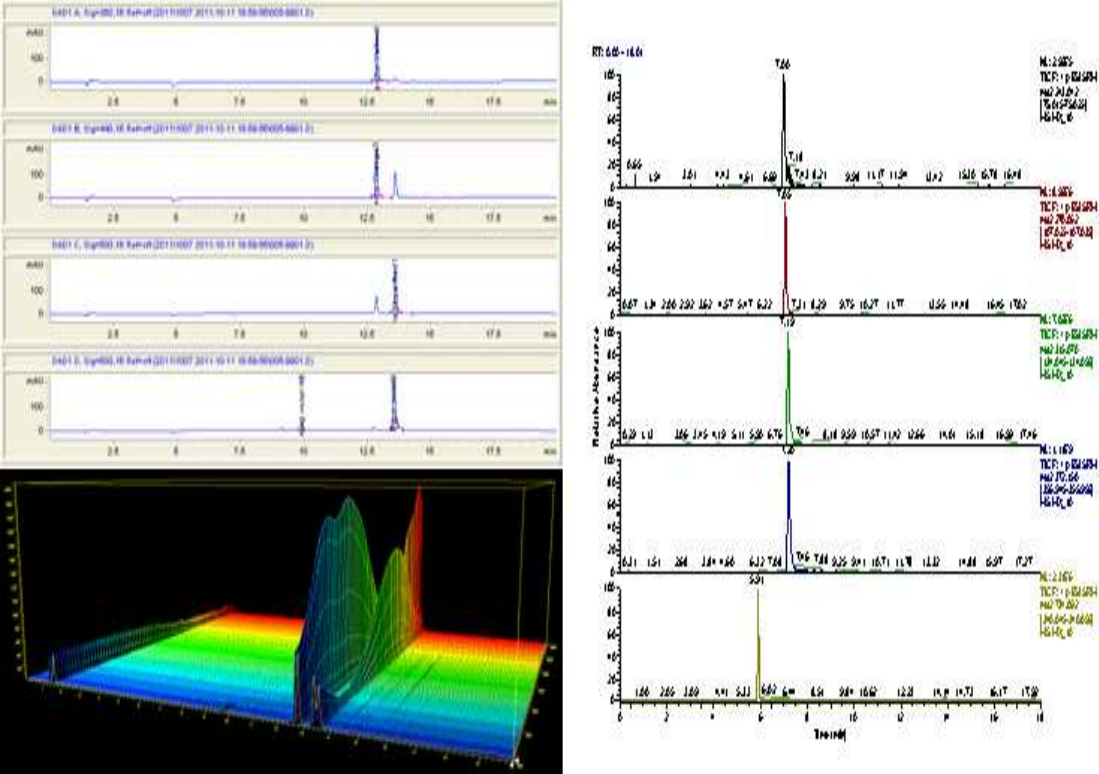


그림 3. 착색제 표준물질 크로마토그램 (예시)

표 5. 시료 분석결과보고 양식 (예시)

어린이 용품 중 착색제 분석결과

시료번호		18-I-12-Y
제품명		○○○
원산지		한국
제조사 / 판매사		○○○ / ○○○
제조년월		2017. 10.
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