[별도게재]

**화장품용 타르색소 중의 유기성 불순물**

**(β-나프틸아민)에 관한 자발적 기준의 실시에 대하여**

**1980년 10월 30일, 55 장공련 제50호**

**일본화장품공업연합회에서 산하회원에게**

화장품용 타르색소 중 적색 205호(리솔레드), 206호(리솔레드OA), 207호(리솔레드BA), 208호(리솔레드SR) 및 220호(딥마룬) 중에 그 제조과정에서 혼입될 우려가 있는 β-나프틸아민의 확인에 대해서는 오래 전부터 연락 드린 바와 같이, 주로 기술위원회를 중심으로,

1. 이들 색소 중의 β-나프틸아민 분석법 개발
2. 시판 색소 중의 β-나프틸아민 분석실시 등 실태조사
3. β-나프틸아민의 인체에 미치는 영향과 화장품 중에 혼입한 경우의 안전율 산출

등의 검토를 추진해 왔습니다.

그 결과, 이들 색소 중에 β-나프틸아민이 설령 1ppm 혼재했다고 해도, 립스틱 등을 통해 인체에 섭취되는 양은 동물실험에 의해 나타나는 최소 발암량의 약 1천만분의 1에서 1억분의 1이라는 극미량이며, 안전성이 매우 높아, 문제는 없다는 평가가 나왔습니다. 또한 분석법의 개발과 아울러 실태를 조사한 결과, 정제원료의 사용, 정제공정의 도입 등에 따라, 상당히 낮은 값으로 컨트롤되고 있는 것으로 판명되었습니다.

하지만, 이러한 물질이 불순물로서 색소 중에 혼입되는 것은 피해야 한다는 관점에서 이들 색소에 대해서는 별책 “화장품용 타르색소 중의 유기성 불순물의 기준”에 따라 만전을 기하기로 하였습니다.

이상의 경과에 따라 당회에서는 색소 업계와 협의한 결과 양해를 구해 향후 색소업자는 적색 205, 206, 207, 208 및 220호의 5개 색소를 납품 시 미리 공적 시험기관 등에서 품질을 조사하고, 별도 기재한 기준에 적합한지 확인한 다음, 그 시험성적표 등을 첨부하여 화장품제조업자에게 납품하게 되었습니다.

관련하여, 이러한 색소를 구입 시에는 이상의 확인에 배려해 주시고, 품질관리와 안전성 확보에 만전을 기할 수 있도록 부탁드립니다.

이상

추신 – 상기 시험의 실시에 대해 아래 기관의 협력을 받았습니다.

도쿄도립위생연구소

재단법인 일본식품분석센터 오사카지점

(별책 “화장품용 타르색소 중의 유기성 불순물 기준” 생략)

**화장품용 타르색소 중의**

**유기성 불순물 기준**

**(첨부 타르색소 중의 β-나프틸아민 시험법)**

1970년 10월 30일

**일본화장품공업연합회**

**화장품용 타르색소 중의 유기성 불순물 기준**

**기준** – 아래 시험법에 따라 β-나프틸아민의 피크 면적은 표준 α-나프틸아민 용액에서 얻을 수 있는 α-나프틸아민의 피크면적을 초과하지 않을 것.

**타르색소 중의 β-나프틸아민 시험법**

본법은 고속액체 크로마토그래피를 이용한 타르색소 중에 혼재할 가능성이 있는 β-나프틸아민(β-NH2)의 시험법이다.

**장치/기구**

고속액체 크로마토그래프, 분광계형광광도계(플로우셀, 셀용량: 70μl), 상하진탕기(200~500rpm), 쿠델나다니슈 농축기(KD 농축기, 농축관용량: 10ml, 농축플라스코 용량: 250~500ml), 컬럼: Lichrosorb NH2(10μ, 4mmidx250mm, 스테인리스제), 원심분리기.

**시약**

α-나프틸아민(α-NH2), 에틸벤젠, 디클로로메탄, 에틸에테르, n-노네인, 헥산, 에탄올, 염화나트륨, 탄산나트륨, 무수황산나트륨, 염산

**시험조작**

시료 2.00g을 50ml 유리 원심분리관에 덜고 에틸에테르 20ml를 추가하여, 초음파 세정기를 이용하여 유리봉으로 교반/추출(10분간) 후, 원심분리(3000rpm 5분간)을 실시하여 상등액을 코마고메 피펫으로 채취한다.

나머지에 에틸에테르 20ml를 추가하여 동일한 조작을 2번 반복한다. 에틸에테르 추출액을 합쳐 분액 로트로 옮기고 0.1N 염산 20ml씩 3회 추출한다(상하 진탕기를 이용하여 각 5분간). 0.1N 염산 추출액을 합쳐 분액 로트로 옮기고, 탄산나트륨 용액(1🡪10) 15ml를 추가하여 알카리성(리트머스 시험지로 확인)으로 한 다음 염화나트륨 15g을 추가하여 디클로로메탄 20ml씩 3회 추출한다(상하 진탕기를 이용하여 각 5분간). 디클로로메탄 용액을 합쳐 하부에 유리솜을 채우고, 무수황산 나트륨 20g을 충전한 유리 컬럼을 통과시켜 탈수한다. n-노네인 디클로로메탄 용액(1🡪50) 10ml를 추가하고, KD 농축기를 이용하여, 수욕 온도 40℃에서 0.3~0.5ml까지 농축하고, 농축관을 붙인 상태로 소량의 헥산으로 모세관 및 농축 플라스크 내벽의 부착물을 농축관 속으로 넣고, 계속해서 헥산을 농축관의 10ml 표선까지 추가해 정용량으로 한다. 이어서 무수황산 나트륨 1g을 추가하여 다시 탈수하고, 그 상등액을 시험용액으로 한다. 시험용액 10μl를 덜어 고속액체 크로마토그래피에 의해 시험한다.

**고속액체 크로마토그래피**

(1) 측정조건

컬럼: Lichrosorb NH2(10μ), 4mmid x 250mm, 40℃

이동상 용매: 2, 3 또는 4% 에탄올/헥산

유속: 1.5ml/mm

검출기: 분광형광광도계

표-1 여기파장 및 형광파장

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | α, β-NH2 | 에틸벤젠 |
| 여기파장(Ex) | 340nm | 280nm |
| 형광파장(Em) | 400nm | 320nm |

(2) 정성법

에틸벤젠 표준용액 및 α-NH2의 표준용액 10μl를 주입하고, 상기 측정조건 하에 각 유지시간을 구해, 사용한 이동상 용액중의 에탄올 농도에 근거하여, α-NH2에 대한 β-NH2의 분리계수를 표-2에서 골라 다음 식에 의해 β-NH2의 유지시간을 구한다.

β-NH2의 유지시간 =(분리계수)(α-NH2의 유지시간-에틸벤젠의 유지시간)+에틸벤젠의 유지시간

표-2. 에탄올 농도와 분리계수의 관계

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| 이동상 용매중의 에탄올 농도 | 2% | 3% | 4% |
| 분리계수 | 1.263 | 1.255 | 1.243 |

(3) 시험법

α-NH2의 표준용액을 10μl 주입하고, 그 피크면적(반값 폭 x 높이)을 구하고, 다음으로 시험용액 10μl를 주입하고, β-NH2에 상당하는 피크면적을 구할 때, 그 피크 면적은 표준용액으로 얻은 α-NH2의 피크면적보다 작아야 한다.

[주해]

1) 아래 5종의 타르색소는 그 구조 및 제조원료 유래 β-NH2의 혼재 가능성을 생각할 수 있다.

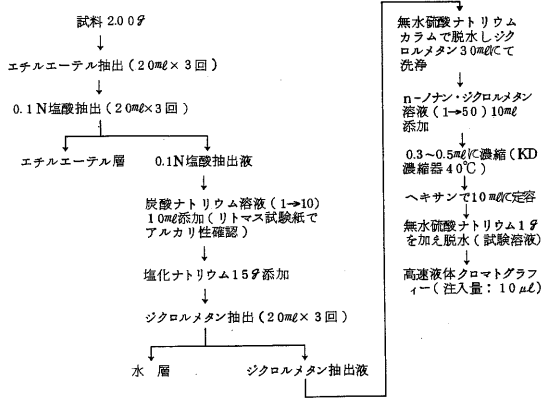
|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  |  |  |
| 적색205호 | 적색206호 | 적색207호 |
|  |  |  |
| 적색208호 | 적색220호 |  |

2) β-NH2는 노동안전위생법을 적용 받는 일반기업 종업원은 1977년 4월 이후 노동기준국장의 허가를 받지 않고, 사용할 수 없게 되기 때문에(인사원규칙 적용을 받는 공무원은 1978년 7월 25일 이후, 인사원 승인이 필요해진) β-NH2를 표준품으로 사용하여 분석하는 것은 사실상 불가능하다고 판단, α-NH2를 대용 표준으로 하는 타르색소 중의 β-NH2 시험법을 정했다.

3) 충전 컬럼의 작성은 점도분석에 의한 슬러리 충전법으로 실시했다. 충전제를 글리세린, 메탄올 혼합용매(35: 65)로 분산시켜, 물을 가압용매로 하여 250~500(kg/cm)로 충전한다.

4) 본법에 이용하는 시약류는 미리 공시험을 실시해 방해가 없음을 확인한다.

5) 시험조작 개요를 그림-1에 나타낸다.



시료 2.00g

에틸에테르 추출(20ml x 3회)

0.1N 염산추출(20ml x 3회)

에틸에테르층

0.1N 염산추출액

탄산나트륨 용액(1→10) 10ml 첨가(리토마스 시험지로 알카리성 확인)

염화나트륨 15g 첨가

디클로로메탄 추출(20ml x 3회)

수층

디클로로메탄 추출액

무수황산 나트륨 컬럼으로 탈수하여 디클로로메탄 30ml로 세정

n-나논 디클로로메탄 용액(1→50) 10ml 첨가

0.3~0.5ml로 농축

(KD 농축기 40℃)

헥산으로 10ml로 정용

무수황산 나트륨 1g을 더해 탈수(시험용액)

고속액체 크로마토그래피(주입량: 10μl)

그림-1 β-NH2 시험법 플로우차트

6) 무수황산 나트륨을 충전하여, 미리 30~50ml의 디클로로메탄으로 세정한 컬럼에 디클로로메탄 추출액을 통과시켜 탈수하고, 계속해서 30ml의 디클로로메탄으로 세정한다.

이들을 합해 다음 농축조작에 제공한다. 더불어, 여과지 여과에서는 β-NH2가 여과지에 흡착되어 회수율은 30% 이하가 된다.

7) β-NH2는 승화성이 있기 때문에 n-노네인을 첨가하여 휘산을 방지하고 있다. 그러나 용매제거 후에는 n-노네인도 서서히 휘산하여 n-노네인이 완전히 사라진 시점에서 β-NH2의 휘산이 급속히 일어난다. 이 때문에 본법에서는 0.3~0.5ml까지 농축하기로 했다.

8) α-NH2의 유지시간은 약 4분 조건이 분석에 최적하지만, 컬럼의 충전상태 등에 따라 유지시간이 다르기 때문에 본법에서의 에탄올 농도는 2, 3 및 4% 중 하나를 골라 α-NH2가 약 4분에 용출되도록 했다.

9) α, β-NH2의 에탄올, 헥산 용액(1🡪20) 중에서의 여기 스펙트럼 및 형광 스펙트럼을 그림-2에 나타냈지만, 본법에서는 Ex: 340nm, Em: 400nm으로 측정하기로 했다.

|  |  |
| --- | --- |
|  | 여기 스펙트럼  (a) : α-NH2  (b) : β-NH2  형광 스펙트럼  (c) : α-NH2  (d) : β-NH2 |

그림2 에탄올 헥산용액(1🡪20)에서의 여기/형광 스펙트럼

10) 에틸벤젠 0.5ml에 헥산을 녹여 100ml로 한다.

11) α-NH2 0.150g을 정확히 덜고 에탄올 10ml를 더해 녹인 후 헥산을 더해 100ml로 한다. 이 액, 1ml를 덜고 헥산을 더해 100ml로 한다. 계속해서 이 액 1ml를 덜고 헥산을 더해 100ml로 한다. 이 액은 1ml중에 α-NH2를 150ng 포함한다.

12) 에틸벤젠을 통과물질로 하고, 7)과 같은 조건으로 분리계수(β-NH2/α-NH2)를 구한 결과, 본문 표-2와 같이 에탄올 농도에 따라 값이 다르기 때문에, 측정 시 각 에탄올 농도에 따라 표-2의 값을 토대로 정성하기로 했다.

더불어, 분리계수는 다음 식에 의해 구하였다.

분리계수 = k’2/k’1

k’1: α-NH2의 캐피시티 비율

k’2: β-NH2의 캐피시티 비율

k’=(tR-tO)/tO

tO: 에틸벤젠의 유지시간

tR: α-NH2, β-NH2의 유지시간

다른 통과물질로서 아세트라센, 나프탈렌에 대해서도 검토한 결과, 아세트라센은 Em: 400nm으로 검출되지만, 에탄올 농도의 감소에 따라 조금씩 컬럼에 유지되어 정확한 k’는 구할 수 없고, 또한, 나프탈렌도 마찬가지로 컬럼에 유지되기 때문에 k’를 구하는데 부적절했다.

13) 2, 3 및 4% 에탄올 헥산 용액을 이동상 용매로 하여 α-NH2 및 β-NH2의 100, 250, 500ppb 헥산 용액을 이용하여, 각각의 검량선을 작성하고, α-NH2에 대한 β-NH2의 검량선 기울기 비율을 구해, 그 상대감도(β-NH2/α-NH2)를 0.75로 했다.

여기서 150ppb, α-NH2 표준액 10μl가 나타내는 α-NH2의 피크면적은 1ppm의 β-NH2를 포함하는 색소를 시료로 하여, 시험법에 따라 조작한 경우에 얻을 수 있는 시험용액 10μl가 나타내는 β-NH2의 피크면적과 같아진다.