

화학물질의 시험방법에 관한 규정

제정 2014. 12. 31. 국립환경과학원 고시 제2014-46호

개정 2015. 4. 30. 국립환경과학원 고시 제2015-8호

개정 2016. 12. 19. 국립환경과학원 고시 제2016-27호

개정 2017. 3. 14. 국립환경과학원 고시 제2017-4호

개정 2018. 4. 9. 국립환경과학원 고시 제2018-12호

개정 2019. 6. 13. 국립환경과학원 고시 제2019-23호

개정 2020. 8. 19. 국립환경과학원 고시 제2020-28호

개정 2020. 11. 3. 국립환경과학원 고시 제2020-46호

개정 2021. 12. 14. 국립환경과학원 고시 제2021-87호

제1조(목적) 이 규정은 「화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률」 제14조제1항 및 동법 시행규칙 제5조제1항제1호 별표1의제8호에 따라 화학물질의 시험방법을 규정함을 목적으로 한다.

제2조(시험방법) 화학물질의 시험방법에 관한 구체적 내용은 별표와 같다.

제3조(시험방법심의위원회) 화학물질의 시험방법의 제·개정 및 운영에 관한 기술적인 검토를 하기 위하여 국립환경과학원장은 화학물질 시험방법 심의위원회를 둘 수 있다.

부 칙

제1조 (시행일) 이 고시는 고시한 날부터 시행한다.

제2조 (경과조치) 이 고시 시행당시 종전의 고시인 화학물질의 시험방법에 관한 규정(국립환경과학원고시 제2020-46호, 2020. 11. 3.)에 의하여 시험 중인 시험은 이 고시에 의한 시험으로 본다.

※ 참고사항 : 이 고시 별지의 세부 내용은 국립환경과학원 홈페이지 (www.nier.go.kr) 「법령정보 → 고시/예규/공고」란에 등록되어 있음을 알려 드립니다.

[별표]

화학물질의 시험방법

순 서

제1장 총칙	1
--------------	---

제2장 물리화학적성질 시험분야

제1항 분배계수시험	3
제2항 녹는점/녹는범위 시험	8
제3항 끓는점시험	18
제4항 물용해도시험	26
제5항 증기압시험	36
제6항 고체 및 액체 밀도시험	60
제7항 입자 크기 분포/섬유길이 및 직경 분포 시험	66
제8항 pH에 따른 가수분해시험	76
제9항 물 해리상수시험	93
제10항 액체의 점도시험	100
제11항 수용액의 표면장력시험	107
제12항 n-옥탄올/물 분배계수시험 : 고속 액체 크로마토그래피법	116
제13항 n-옥탄올/물 분배계수시험 : 완속교반법	131
제14항 인화점시험	146
제15항 인화성시험	149
제16항 폭발성시험	154
제17항 자연발화성 및 자연발화점 시험	168
제18항 산화성시험	171
제19항 회분식 평형방법을 사용한 흡착 및 탈착 시험	178
제20항 액체크로마토그래피법에 의한 토양 및 하수 침전물의 흡착계수산정시험	226
제21항 나노물질의 입자크기 및 크기분포 시험	236
제22항 모의 환경매체에서 나노물질의 분산안정성 시험	247

제3장 생태영향 시험분야

제1항 담수조류 성장저해시험	266
제2항 물벼룩 급성독성시험	279

제3항 어류 급성독성시험	290
제4항 조류 번식독성시험	304
제5항 지렁이 급성독성시험	313
제6항 육생식물 생장시험	321
제7항 식물에 대한 만성독성시험	326
제8항 활성슬러지 호흡저해 시험	341
제9항 어류 초기생장단계독성시험	349
제10항 물벼룩류 생식능시험	357
제11항 어류배아 및 난황단계 치어 독성시험	366
제12항 어류 유생성장시험	375
제13항 지렁이 번식독성시험	386
제14항 깔따구 독성시험(퇴적물에 시험물질을 첨가하는 시험)	401
제15항 깔따구 독성시험(물에 시험물질을 첨가하는 시험)	417
제16항 어류배아 급성독성시험	434

제4장 분해성 및 농축성 시험분야

제1항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)	447
제2항 미생물분해시험(이분해성) : 이산화탄소 발생량 측정시험	459
제3항 미생물분해시험(이분해성) : MITI 수정시험 I	471
제4항 미생물분해시험(이분해성) : 밀폐시험병을 이용한 용존산소 소모량 측정 시험	483
제5항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(II)	495
제6항 미생물분해시험(이분해성) : 압력계를 이용한 산소 소모량 측정시험	507
제7항 미생물분해시험(본질적 분해성) : MITI 수정시험 II	519
제8항 토양미생물 영향 시험	528
제9항 생물농축성시험	541
제10항 토양 내 호기성 및 혐기성 전환 시험	550
제11항 수중 퇴적물에서의 호기성 및 혐기성 전환시험	562
제12항 지표수의 호기성분해 : 모의 생분해성 시험	571
제13항 미생물분해시험(본질적 분해성) : SCAS 수정시험	590
제14항 미생물분해시험(본질적 분해성) : Zahn-Wellens/EVPA 시험	596

제5장 건강영향 시험분야

제1항 급성 경피독성시험	603
제2항 급성 흡입독성시험	611
제3항 피부 자극성 및 부식성시험	620
제4항 눈 자극성 및 부식성시험	627
제5항 피부 과민성시험	635
제6항 28일 반복경구투여독성시험	643
제7항 90일 반복경구투여독성시험	653
제8항 21 일/28 일 반복 경피투여독성시험	664
제9항 90 일 반복 경피투여독성시험	670
제10항 28 일 반복 흡입독성시험	677
제11항 90 일 반복 흡입독성시험	692
제12항 최기형성시험	708
제13항 2 세대 생식독성시험	717
제14항 독성동태시험	727
제15항 급성 경구독성시험(고정용량법)	735
제16항 생식 및 발달(발생)독성 스크리닝시험	744
제17항 급성 경구독성시험(독성등급법)	753
제18항 설치류 신경독성시험	761
제19항 생체외 피부 부식성시험(피부 전기저항성시험)	769
제20항 생체외 피부 부식성시험(인체 피부모델시험)	779
제21항 발암성시험	791
제22항 유전독성시험(박테리아를 이용하는 복귀돌연변이시험)	799
제23항 유전독성시험(포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험)	808
제24항 유전독성시험(포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험)	818
제25항 유전독성시험(포유류 정원세포를 이용하는 염색체이상시험)	828
제26항 급성 경구독성시험(용량고저법)	835
제27항 생체외 피부 자극성시험(인체피부모델시험)	846
제28항 유전독성시험(생체외 포유류세포 유전자 돌연변이시험)	856
제29항 유전독성시험(설치류 우성치사시험)	863

제30항 유전독성시험(포유류 골수세포를 이용하는 염색체이상시험)	870
제31항 유전독성시험(마우스 유전성 전좌시험)	879
제32항 유전독성시험(포유류 간세포를 이용하는 비정기적 DNA 합성시험)	886
제33항 피부과민성시험(국소림프절시험, LLNA)	893
제34항 피부과민성시험(국소림프절시험, LLNA: DA)	900
제35항 피부과민성시험(국소림프절시험, LLNA: BrdU-ELISA)	908
제36항 화학적 피부과민성시험(펩티드결합성시험, 아미노산유도체 결합성시험)	924
제37항 생체 외 피부과민성시험(ARE-Nrf2 루시퍼라제시험)	947
제38항 급성 흡입독성시험(독성등급법)	973
제39항 유전독성시험(포유류를 이용한 생체 내 알칼리코멧시험)	997
제40항 비설치류에 대한 90일 반복경구투여독성시험	1007
제41항 병합 생식/발달 독성 선별 시험 및 반복투여독성시험	1015
제42항 발달신경독성시험	1030
제43항 피부흡수시험: 생체내 시험	1046
제44항 피부흡수시험: 생체외 시험	1052
제45항 생체외 3T3 NRU 광독성시험	1058
제46항 피부부식성평가를 위한 생체외 장벽막시험	1070
제47항 소 각막 혼탁도와 투과도(BCOP)시험	1076
제48항 닭 적출 안구(ICE)를 이용한 눈 자극시험	1090
제49항 설치류 자궁비대 반응시험	1102
제50항 랫드 수컷 성선비대 반응시험	1108
제51항 확장 1세대 생식 독성시험	1114
제52항 만성 독성시험	1139
제53항 만성독성/발암성 병합시험	1150
제54항 에스트로겐 수용체 전사활성시험	1164
제55항 H295R 스테로이드 합성 분석법	1174
제56항 눈 부식성 및 자극성 플루오레세인 누출시험	1181
제57항 생체외 포유류 세포 소핵시험	1188
제58항 형질전환 설치류 체세포 및 생식세포 유전자 돌연변이 분석법	1202
제59항 급성 흡입독성시험(고정농도법)	1211

제60항 생체외 피부과민성시험	1225
제61항 안드로겐 수용체 전사활성시험	1250
제62항 유전독성시험(티미딘 키나제 유전자 돌연변이시험)	1281
제63항 생체외 눈 자극 및 손상시험(토끼각막세포주시험)	1292
제64항 생체외 눈 자극 및 손상시험(인체각막모델시험)	1299
제65항 에스트로겐 수용체 결합 측정시험	1311
제66항 유기인계 화합물의 지발성 신경독성시험: 급성경구독성시험	1326
제67항 유기인계 화합물의 지발성 신경독성시험: 28일 반복투여독성시험	1331
제68항 비트리젤(Vitrigel)을 이용한 눈 자극성 시험	1336
제69항 활성산소종 측정을 이용한 광반응성 시험(ROS 시험)	1345
제70항 생체 외 눈 자극 및 손상시험(거대분자시험법)	1354

제1장 총 칙

I. 목적

이 시험방법은 「화학물질의 등록 및 평가 등에 관한 법률」 (이하“법”이라 한다) 제14조제1항 및 동법 시행규칙 제5조제1항제1호 별표 1에 따라 화학물질의 유해성심사 또는 유해성평가에 필요한 시험을 수행함에 있어 신뢰할만한 결과를 도출하기 위한 표준화된 시험방법을 제공함을 목적으로 한다.

II. 적용범위

이 시험방법은 법 제2조(정의)의 “화학물질” 중 유해성심사 또는 유해성평가 대상 화학물질의 유해성여부의 판단이나, 분류기준 적용 등에 활용된다.

이 시험방법에서 다루지 않은 시험방법에 대해서는 경제협력개발기구에서 정한 시험방법 (OECD Guidelines for the Testing of Chemicals) 등 국제적으로 통용되는 시험방법에 따라 수행할 수 있으며, 이 경우 고시된 시험방법으로 인정할 수 있다.

III. 시험방법의 구성

이 시험방법은 크게 “물리화학적성질 시험분야”, “생태영향 시험분야”, “분해성 및 농축성 시험분야” 및 “건강영향 시험분야”의 네 분야로 구성되어 있다.

1. 물리화학적성질 시험분야

화학물질의 물리적, 화학적 특성을 파악하기 위한 시험으로 구성되어 있다.

2. 생태영향 시험분야

화학물질이 생태계를 구성하는 생물들에 미치는 영향을 파악하기 위해 생태계의 각 영양단계를 대표할 수 있는 생물종에 대한 영향을 평가할 수 있는 시험으로 구성되어 있다.

3. 분해성 및 농축성 시험분야

화학물질이 환경 중에서 분해되는 정도 및 생물체 내에 축적되는 정도 등을 파악하는 시험방법으로 구성되어 있다.

4. 건강영향 시험분야

화학물질이 인간 건강에 미치는 영향을 간접적으로 평가하기 위해 설치류 등의 동물이나 세포 또는 미생물 균주 등을 대상으로 유해성을 파악하는 시험방법으로 구성되어 있다

제2장 물리화학적성질 시험분야

제1항 분배계수시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 환경 중 거동을 예측하기 위해 n-옥탄올과 물 사이에 분배되는 정도를 측정하는데 목적이 있다. 용기진탕법에 의한 측정범위는 분배계수의 대수치($\log P_{ow}$)가 -2에서 5 사이의 화학물질에 적용된다.

2. 정의

분배계수(P) : 서로 섞이지 않는 두 용매에 녹아있는 화학물질의 평형농도비

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 항온조, 항온수조 또는 항온실

시험온도로 조정 가능한 것

1.1.2 원심분리기

온도제어장치를 갖추어 시험온도로 조절 가능한 것

1.1.3 진탕기

평형용기를 수직으로 180 도 회전(회전수 = 20 회/분) 가능한 것

1.1.4 시험용기

유리, 불소수지 또는 테프론 재질의 마개달린 원심분리용 시험관 또는 플라스크

1.2 용매의 조제 및 시험물질용액의 조제

1.2.1 수포화 n-옥탄올

(1) n-옥탄올의 정제

n-옥탄올(98 % 이상)에 0.1 N 황산을 가하여 진탕한 후, 정치하여 분리된 황산층을 제거한다. 계속해서 0.1 N 수산화나트륨용액을 가하여 진탕한 후, 정치하여 분리된 수산화나트륨층을 제거한다. 중성으로 될 때까지 물을 가하여 반복한다. 무수황산마그네슘으로 탈수하고, 감압증류장치를 이용하여 2 회 증류한다. 증기압이 유사한 유기불순물에 대해서는 적절한 방법으로 제거한다. 정제된 n-옥탄올의 순도는 99.9 % 이상이어야 한다. 순도 99.9 % 이상의 특급 n-옥탄올에 대해서는 정제하지 않고 사용할 수 있다.

(2) 물과의 혼합

정제한 n-옥탄올을 유리용기에 넣고 n-옥탄올에 물이 포화될 수 있도록 포화량 이상의 물(주 1)을 가하여 24 시간 이상 서서히 교반 또는 진탕한 후 두층이 분리되도록 충분한 시간동안 정치하고 분리한다.

1.2.2 n-옥탄올 포화수

(1) 물의 정제

이온교환수 또는 증류수를 유리제 또는 석영제의 증류장치에서 재증류하여 정제한다.

(2) n-옥탄올과의 혼합

정제한 물을 유리용기에 넣고 물에 n-옥탄올이 포화될 수 있도록 포화량 이상의 n-옥탄올을 가하여 24 시간 이상 서서히 교반 또는 진탕한 후 두층이 분리되도록 충분한 시간동안 정치하고 분리한다.

1.2.3 시료용액의 조제

(1) 시료의 순도

가능한 한 순도가 높은 것을 사용한다.

(2) 시료용액의 조제

수포화 n-옥탄올에 녹여 1 mg/mL ~ 100 mg/mL 범위의 농도로 조제하여 이를 시험용 저장원액으로 하여 냉장고에 보관한다. 시료 일정량을 정밀히 달아 시험 농도를 정확하게 측정할 수 있어야 한다.

1.3 시험온도

시험온도는 20 °C ~ 25 °C의 범위에서 ± 1 °C를 유지해야 한다.

1.4 시험 및 측정조건의 설정

1.4.1 시료 사용량, n-옥탄올/물(v/v)비 및 용매의 양

시료농도 및 유기용매의 비율은 다음의 양을 참고하여 설정한다.

- (1) 분배계수의 예비계산으로 얻은 분배계수의 추정치
- (2) 수층 및 n-옥탄올층의 분석에서 분석방법의 한계치 이상의 농도에 해당하는 시료의 양
- (3) 수층 및 n-옥탄올층 중 시료의 최대 농도한계는 0.01 mol/L로 할 것
- (4) 시험용기 내에서 차지하는 용매의 전체 부피는 용기의 90 % 이상일 것

1.4.2 측정조건

다음에서 정하는 유기용매 양을 사용하여 각각의 $\log P_{ow}$ 를 구한다.

- (1) 1.4.1에서 산정된 용량비로 용매를 가한다.
- (2) 수포화 n-옥탄올의 양을 (1)의 2 배로 가한다.
- (3) 수포화 n-옥탄올의 양을 (1)의 1/2 배로 가한다.

1.4.3 측정회수 및 허용편차

측정조건마다 2 회 측정하여 모두 6 회 측정하며 허용편차는 $\pm 0.3 \log P_{ow}$ 이내로 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

분배계수를 결정하기 위해서는 시험계에 작용하는 모든 요소 사이에 평형이 이루어져야 하며 두 층에 녹아 있는 물질의 농도를 결정해야 한다. 분석하고자 하는 평형농도를 결정하기 위해서는 두 층을 충분히 혼합하고 정치시킨 후 두 층이 완전히 분리되었을 때 각 층을 취해야 한다.

2.2 시험절차

2.2.1 시험용기에 1.4에서 설정한 양의 시료원액을 정확히 취한다.

2.2.2 이 시험용기에 1.4에서 산정된 양의 수포화 n-옥탄올과 n-옥탄올 포화수를 정확하게 가한다.

2.2.3 시험온도를 유지하면서 진탕기를 이용해서 시험용기(주 2)를 5 분간 진탕(회전수 20 회/분)한다. 또한 진탕기를 이용하지 않는 경우에는 시험용기를 재빨리 180 도 회전(회전수 20 회/분)시켜 시험용기의 공기가 두층을 통과하도록 진탕한다.

2.2.4 시험온도를 유지하면서 시험용기를 두층의 분리에 필요한 속도로 20 분간 원심분리 한다. 원심분리 시 온도조절이 불가능할 경우에는 시료채취 전에 원심분리관을 시험온도에서 1 시간 이상 방치한다.

2.2.5 n-옥탄올층의 중앙부로 피펫의 선단을 넣어 n-옥탄올층의 약 1/2 용량에 해당하는 n-옥탄올을 취한다.

2.2.6 피펫의 외벽을 여지 등으로 닦고 n-옥탄올을 다른 용기로 옮긴다.

2.2.7 수층의 시료채취는 주사바늘이 분리되는 주사기를 이용한다.

(1) 주사기의 일부에 공기를 넣고, 주사바늘이 옥탄올층을 통과 때 공기가 천천히 나가면서 수층에 도달하도록 한다.

(2) 적당량의 시료를 주사기에 흡입한 후 신속하게 주사바늘을 분리시키고 수층을 다른 용기로 옮긴다.

2.2.8 시료에 가장 적당한 분석방법(주 3)을 선택하여 n-옥탄올층 및 수층중의 시료를 정량한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

분배계수는 다음 식으로 산출한다.

$$P = \log P_{ow}$$

$$P_{ow} : C_o/C_w$$

$$C_o : n\text{-옥탄올 중 시료농도}(\text{mol/L})$$

$$C_w : \text{물층 중 시료농도}(\text{mol/L})$$

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

- 2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간
- 2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
(2) 입수처, 입수일
(3) 순도 또는 불순물
- 2.5 시험결과 : (1) 시험물질의 순도
(2) 시험온도
(3) 계산에 의해 구한 분배계수치와 계산방법
(4) 분석방법
(5) 옥탄올과 물 층에서의 시료의 농도
(6) 각 시험조건에서의 분배계수 시험치, 평균치 및 전체 평균치
(7) 분배계수 평균치에 대한 표준편차
(8) log치로 표시한 시험물질의 분배계수치

주1) 물은 1.2.2(1)에 따라 정제한 것을 사용한다.

주2) 시험용기로서 플라스크를 사용한 경우에는 수층의 일부로 원심분리용 시험관을 세정한 후 옮긴다.

주3) KS에서 규정한 분석방법통칙(흡광광도분석법, 액체크로마토그래프법, 가스크로마토그래프법, 질량분석법 등)에 의한다.

제2항 녹는점/녹는범위 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 고체 상태에서 액체 상태로 혹은 액체 상태에서 고체 상태로 전이되는 온도 또는 온도 범위를 결정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 녹는점(Melting point)

대기압 하에서 고체상에서 액체상으로 전이될 때의 온도

2.2 섭씨온도(°C)를 켈빈온도(K)로 변환하는 식은 다음과 같다.

$$T = t + 273.15$$

여기에서, T : 켈빈온도(K)

t : 섭씨온도(°C)

II. 시험

1. 원리

물질의 녹는점은 불순물에 상당히 영향을 받기 때문에 녹는점을 물질의 순도 측정에 사용하기도 한다. 본 시험법에는 물질의 순도와 관계없이 적용할 수 있는 방법과 장치들이 수록되어 있다. 본 시험의 기본 원리는 주 1과 2에 자세히 설명되어 있다. 시험방법은 물리적 응집 상태 및 분쇄 용이성 등 시험물질의 특성에 따라 선택할 수 있다. 다양한 장치 및 절차를 설명하는 표준 시험법 목록은 주 3에 수록되어 있다. 여러 시험방법들의 측정 온도범위 및 정확도는 <표>와 같다.

<표> 시험방법별 측정 온도 범위 및 정확도

시험방법	온도 범위(K)	정확도(K)
액상중탕 모세관 (Capillary/liquid bath)	273 ~ 573	± 0.3
금속 블록 모세관 (Capillary/metal block)	293 ~ > 573	± 0.5
코플러 핫 바 (Kofler hot bar)	293 ~ > 573	± 1.0
용융 현미경 (Melt microscope)	293 ~ > 573	± 0.5
시차열분석 및 시차주사열량계 (Differential thermal analysis and differential scanning calorimetry)	173 ~ 1,273	± 0.5 (최대 600 K) ± 2.0 (최대 1,273 K)
어는점 (Freezing temperature)	223 ~ 573	± 0.5
유동점 (Pour point)	223 ~ 323	± 3.0

2. 시험방법

2.1 액상중탕장치 내 모세관법(Capillary tube in a liquid bath)

2.1.1 장치 및 기구

시험장치는 그림 1과 같으며 유리 재질로 되어 있다. 중탕장치 내 액체의 종류는 측정하려는 물질의 녹는점에 따라 결정한다. 녹는점이 473 K 이하인 경우 액체 파라핀을, 573 K 이하인 경우 실리콘 오일을, 573 K 이상인 경우 황산과 황산 칼륨의 무게비가 3 : 2인 혼합용액을 사용한다. 혼합용액을 사용할 경우 표준 ASTM E 1-71, DIN 12770, JIS K 8001 또는 이에 상응하는 표준 규격을 만족하는 온도계를 사용하여야 한다. 온도계의 수은구 중앙 부분은 시료가 놓이는 모세관에 닿아야 한다.

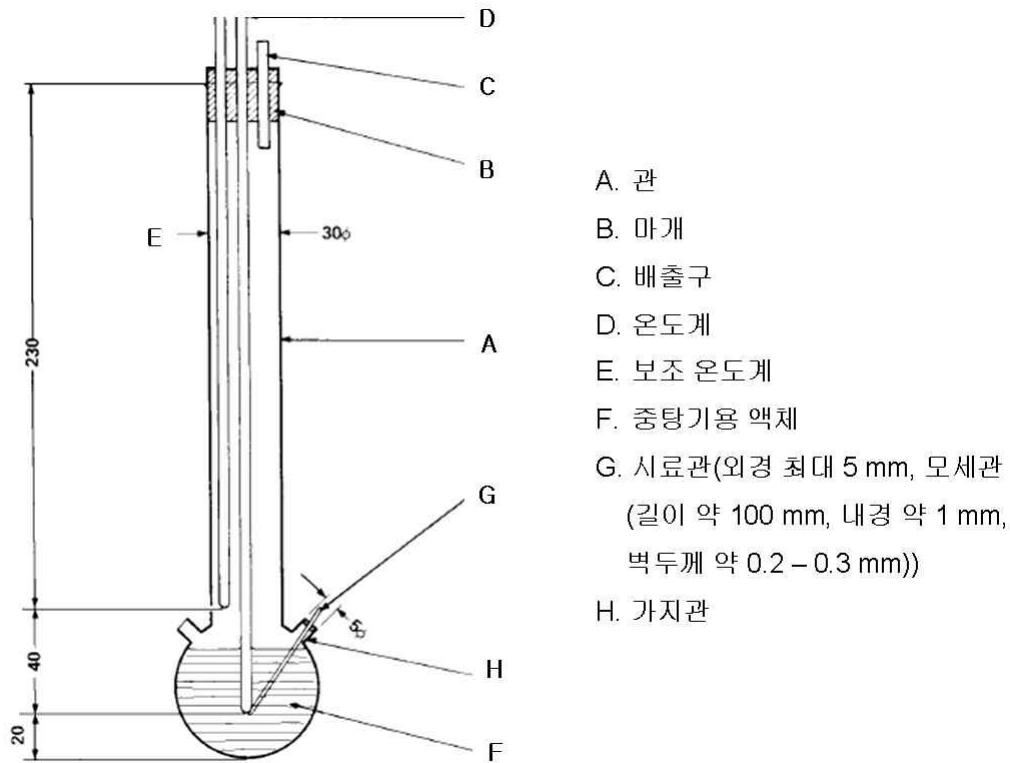
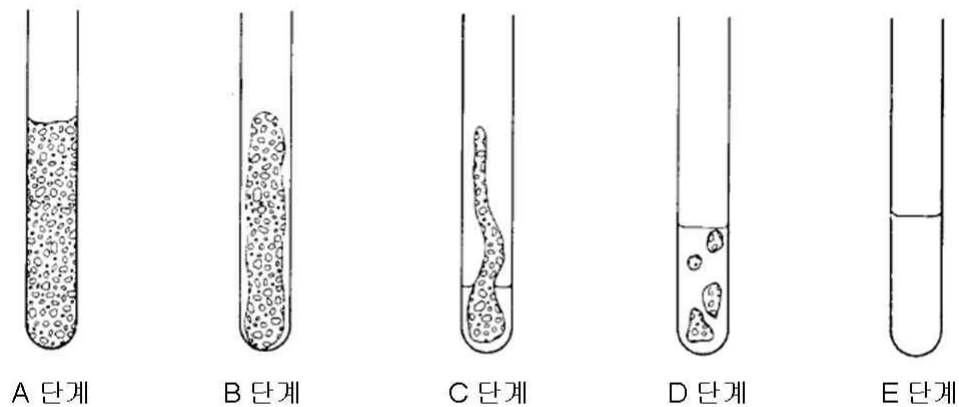


그림 1. 액상중탕장치 내 모세관법 장치도(단위 : mm)

2.1.2 시험절차

건조된 시료를 미세하게 분쇄하여 한 쪽 끝을 봉인한 모세관에 시료의 충전량이 약 3 mm가 되도록 균일하게 채워 넣는다. 중탕장치는 온도가 분당 약 3 K씩 상승하도록 가열하고 교반시킨다. 일반적으로 온도가 녹는점의 약 10 K 아래까지 상승하면 모세관을 장치에 장착한다. 모세관 장착 후에는 온도가 분당 최대 1 K씩 상승하도록 조절한다. 온도가 서서히 상승하는 조건에서 미세하게 분쇄된 물질들은 일반적으로 그림 2와 같은 녹는 양상을 보인다. 녹는점을 측정할 때, 녹기 시작하는 단계(그림 2의 A 단계)부터 마지막 단계(그림 2의 E 단계)까지의 온도를 기록한다.



A 단계 : 녹기 시작. 미세한 물방울이 관 내벽에 균일하게 달라붙는다.

B 단계 : 용해물 수축으로 시료와 내벽 사이에 틈이 생긴다.

C 단계 : 수축된 시료가 붕괴되어 액화된다.

D 단계 : 완전한 메니스커스가 형성되지만 시료의 일부분은 고체로 남아있다.

E 단계 : 녹는 마지막 단계. 고체 입자가 남아있지 않다.

그림 2. 화학물질의 녹는 단계

보정 녹는점은 아래의 식을 이용하여 계산한다.

$$T = T_D + 0.00016(T_D - T_E)n$$

여기에서, T = 보정 녹는점

T_D = 온도계 D에서 읽은 수치

T_E = 온도계 E에서 읽은 수치

n = 온도계 D에서 액면 위로 노출된 눈금 수

2.2 금속블록장치 내 모세관법(Capillary tube in a metal block)

2.2.1 장치 및 기구

- (1) 관측 장치 : 관측 장치는 다음으로 구성되며 그림 3에 관측 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다.

- ① 상부가 공동화 되어있는 원통형 금속 블록
- ② 모세관을 장착할 수 있는 2 개 이상의 구멍을 갖는 금속 마개
- ③ 일정 전력이 공급되도록 조절된 전기 가열 장치
- ④ 챔버 하단 외벽에 4 개의 내열 유리창(내부관찰용 감시창 1 개와 조명용 3 개)
- ⑤ 표준 온도계(액상중탕장치 내 모세관법에서 언급한 규격에 맞는 온도계 또는 이에 상응하는 정확도를 가진 열전기 측정 장치)

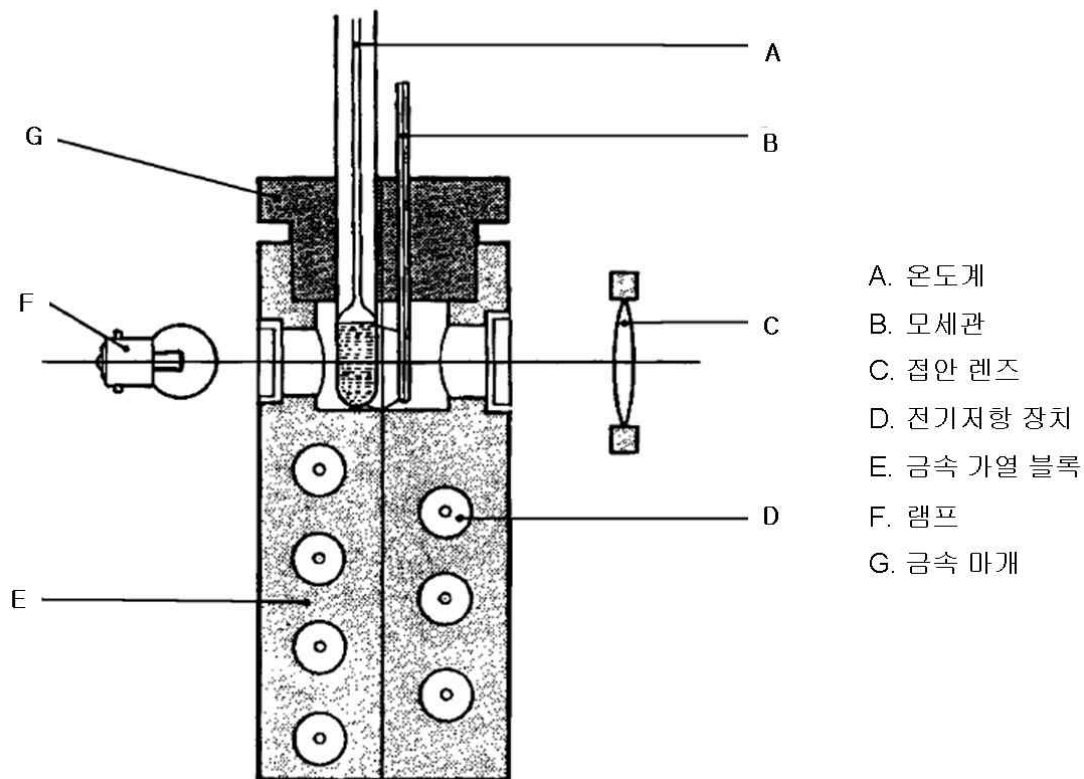


그림 3. 금속 블록 모세관 장치도

(2) 광전지 검출(Photocell detection) 장치

2.2.2 시험절차

2.1.2 액상중탕장치 내 모세관법에서 설명한 방식으로 시험물질을 채운 모세관을 가열된 금속 블록에 장착하고 일정한 비율로 온도를 상승시킨다. 광선은 시료를 통

해 광전지로 향하도록 한다. 시험물질이 녹기 시작하면 광전지에 도달하는 빛의 세기가 증가하며 정지 신호가 디지털 표시기에 전달되어 가열 챔버의 온도를 표시한다.

2.3 코플러 핫 바(Kofler hot bar)

2.3.1 장치 및 기구

이 장치는 서로 다른 열전도도를 갖는 두 개의 금속을 사용한 장치로 바(Bar)는 전기로 가열되고 온도 변화율이 바의 길이와 비례하도록 고안된 장치이다. 코플러 핫 바의 온도 범위는 대략 실온에서부터 573 K까지이며 온도 눈금과 이동식 바늘이 장착되어 있다.

2.3.2 시험절차

시험물질을 코플러 핫 바 위의 얇은 층에 놓으면, 잠시 후 고체상과 액체상 사이에 경계선이 뚜렷하게 생긴다. 바늘을 경계선에 맞게 조정하여 경계선 온도를 읽는다.

2.4 용융 현미경법(Melt microscope)

2.4.1 장치 및 기구

용융 현미경의 제물대는 금속판으로 만들어져 있으며 이는 가열 챔버의 일부이다. 금속판에 나 있는 구멍을 통해 광원으로부터 빛이 들어오도록 고안되어 있다.

2.4.2 시험절차

제물대 상부의 구멍 위에 슬라이드를 놓고 이 위에 시험물질을 놓는다. 이때 공기에 노출되는 것을 최소화하기 위해 또 다른 슬라이드로 덮는다. 시료가 녹기 시작할 때까지 금속판을 가열하고 온도를 기록한다. 이 방법은 편광을 사용하기 때문에 결정체 물질을 대상으로 측정할 때 측정값의 정확도를 높일 수 있다.

2.5 시차열분석(DTA, Differential thermal analysis)

시험물질과 표준물질을 동일한 온도 조절 프로그램으로 처리하며 시험물질이

상전이할 때, 이에 상응한 엔탈피 값 변화로 인해 온도 기록 기준선을 이탈한 흡열 또는 발열 반응이 나타난다.

2.6 시차주사열량계(DSC, Differential scanning calorimetry)

시험물질과 표준물질을 동일한 온도 조절 프로그램으로 처리한다. 시험물질과 표준물질을 똑같은 온도로 유지시키기 위해 필요한 입력 에너지 차이를 기록한다. 시험물질이 상전이를 할 때 이에 상응한 엔탈피 값이 변해 열전달 기록 기준선을 벗어난다.

2.7 어는점(Freezing temperature)

시험물질을 시험관에 넣고 지속적으로 교반시킨다. 시험물질을 냉각시키면서 일정한 간격으로 온도를 측정한다. 수차례 측정하여 온도가 일정하게 유지될 때 이 온도를 어는점 온도로 기록한다(이때 온도계 상에서 발생할 수 있는 오차를 보정한다). 이때 고체상과 액체상 사이의 평형을 유지시켜 과냉각이 일어나지 않도록 주의한다.

2.8 유동점(Pour point)

본 시험방법은 석유에 대한 시험법으로 개발되었으며, 녹는점이 낮은 유성 물질의 녹는점 측정에 적합하다. 시험물질을 예열한 다음 냉각시켜 3 K마다 흐름 특성(Flow characteristics)을 관찰한다. 시험물질의 움직임이 관찰되는 최저 온도를 유동점으로 기록한다.

3. 시험상의 유의사항

별도의 표준물질은 필요치 않으며 검정용으로 사용되는 일부 표준물질은 주 4를 참조한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

녹는점은 최소 2 개 이상 측정치의 평균값으로 기록한다. 녹기 시작한 단계와 최종 녹는 단계의 온도차가 정확도 범위 내에 있을 경우 최종 녹는 단계의 온도를 녹는점으로 간주한다. 그렇지 않을 경우에는 두 온도 모두를 기록한다. 시험 물질이 녹기 전에 분해되거나 승화되는 경우에는 그 온도를 기록한다.

2. 시험결과와 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 측정에 사용된 방법

(2) 시험물질의 특성 및 불순물

(3) 정확도

(4) 녹는점

(5) 결과 해석과 관련된 정보 (불순물 및 물리적 상태 등)

- 주1) Le Neindre, B. and Vodar B., eds. (1975). IUPAC, Experimental Thermodynamics, Vol.II, Butterworths, London, pp. 803 to 834
- 주2) Weissberger, R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Vol. I, Part I, Chapter VII, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York.
- 주3) 표준 시험법 목록
1. 액상중탕장치 내 모세관
 - (1) ASTM E 324-69 : 유기 화합물의 초기 및 최종 녹는점과 녹는 범위 측정 표준 시험법
 - (2) BS 4634 : 녹는점 및 녹는 범위 측정법
 - (3) DIN 53181 : Bindemittel für Lacke und ähnliche Beschichtungsstoffe; Bestimmung des Schmelzbereiches von Harzen nach Kapillar-Verfahren
 - (4) JIS K 00-64 : 화학물질 제품의 녹는점 시험법
 2. 금속블록장치 내 모세관
 - (1) DIN 53736 : Visuelle Bestimmung der chmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
 3. 코플러 핫 바
 - (1) ANSI/ASTM D 3451-76 : 고분자 분말 및 분말 코팅제품에 대한 표준 권장 실험
 4. 용융 현미경
 - (1) DIN 53736 : Visuelle Bestimmung der chmelztemperatur von teilkristallinen Kunststoffen
 5. 시차열분석 및 시차주사열량계
 - (1) ASTM E 472-86 : 열분석 자료 보고를 위한 표준 실험
 - (2) ASTM E 473-85 : 열분석 관련 표준 용어 정의
 - (3) ASTM E 537-76 : 시차열법분석법을 이용한 화학물질의 열안전성 평가 표준 시험법
 - (4) DIN 51005 : Thermische Analyse (TA)
 6. 어는점
 - (1) BS 4633 : 결정점 측정법
 - (2) BS 4695 : 석유왁스의 녹는점 측정법 (냉각곡선)
 - (3) DIN 51421 : Bestimmung des Gefrierpunktes von Flugkraftstoffen, Ottokraftstoffen und Motorenbenzolen
 - (4) DIN 53175 : Bestimmung des Erstarrungspunktes von Fettsäuren

(5) ISO 1392 : 결정점 측정법

(6) ISO 2207 : 석유 왁스류 응집점 측정법

(7) JIS K 00-65 : 화학제품의 어는점 측정법

(8) NF T 60-114 : Point de fusion des paraffines

(9) NF T 20-051 : Méthode de détermination du point de cristallisation

7. 유동점

(1) ASTM D 97-66 : 석유의 유동점 측정을 위한 표준 시험법

(2) ISO 3016 : 석유의 유동점 측정법

(3) NBN 52014 : Echantillonnage et analyse des produits de pétrole: Point de trouble
et point d'écoulement limite

주4) IUPAC (1976). Physicochemical measurements: Catalogue of reference materials from
national laboratories, Pure and Applied Chemistry, 48, 505 to 515

제3항 끓는점 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 다양한 방법을 통해 화학물질의 끓는점을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 액체의 끓는점(Boiling point)

증기압이 표준 대기압(101.325 kPa)과 같아지는 온도

2.2 끓는점에서 온도 단위는 K로 나타내며, 별도의 언급이 없으면 압력은 표준 대기압을 의미한다. 섭씨온도(°C)를 켈빈온도(K)로 전환하는 식은 다음과 같다.

$$T = t + 273.15$$

여기에서, T : 켈빈온도(K)

t : 섭씨온도(°C)

압력 단위는 kPa이며 다음의 환산식이 사용된다.

$$1 \text{ bar} = 100 \text{ kPa}$$

$$1 \text{ mmHg(또는 Torr)} = 0.133 \text{ kPa}$$

$$1 \text{ atm} = 101.325 \text{ kPa}$$

II. 시험

1. 원리

일반적으로 끓는점은 대기압에서 측정되며 측정 후 표준 끓는점으로 환산되어야 한다. 끓는점이 높은 물질 또는 가열에 의해 분해되는 물질의 경우에는 감압 조건에서 끓는점을 측정하는 것이 적절하지만 압력 범위를 외삽법으로 계산할 경우 오차가 발생하기 쉽다. 표준 끓는점 부근의 제한된 온도 범위에서 증발열이 일정하다는 가정 하에 아래의 Clapeyron-clausius식을 적용할 수 있다.

$$\log p = \Delta H_v / 2.3 \cdot RT + \text{상수}$$

여기에서, p = 물질의 증기압(Pa)

ΔH_v = 증발열(J/mol)

R = 기체 상수(8.314 J/mol · K)

T = 열역학적 온도(K)

불순물이 시험물질의 끓는점에 미치는 영향은 해당 불순물의 특징에 따라 크게 달라진다. 시험물질에 휘발성 불순물이 함유된 경우에는 정제하여야 한다. 본 시험법은 끓는점 이하에서 화학적 변화(예 : 자동산화, 전위, 분해 등)를 일으키지 않는 액체 및 녹는점이 낮은 시험물질에 적용할 수 있다. 자세한 기초 원리는 주 1과 2에 수록되어 있다.

다양한 장치 및 절차를 설명하는 표준 시험법 목록은 주 3에 수록되어 있다. 여러 시험방법들의 적용 및 정확도는 <표>과 같다. 광전지 검출법과 시차열분석법은 같은 장비를 사용해 끓는점과 녹는점을 함께 측정할 수 있으며 자동화하기 쉽다는 장점이 있다. 동적 방법은 증기압 측정에 적용할 수 있으며 정압기를 사용할 경우 표준 기압으로 끓는점을 보정할 필요가 없다는 장점이 있다.

2. 시험방법

2.1 끓는점 측정기(Ebulliometer)

본 장치는 끓는점 오름에 의한 분자량 계산을 위해 고안된 장치로 정확한 끓는점 측정에도 적합하다. 대기압 하에서 액체가 끓을 때까지 평형상태로 가열한다. 장치는 ASTM-D 1120-72(주 3)에 설명되어 있다.

<표> 시험방법의 종류 및 방법별 정확도

시험방법	정확도(K)
끓는점 측정기 (Ebulliometer)	± 1.4 K(최대 373 K까지) ¹⁾ ± 2.5 K(최대 600 K까지) ¹⁾
동적 방법 (Dynamic method)	± 0.5 K(최대 600 K까지)
증류법 (Distillation method)	± 0.5 K(최대 600 K까지)
Siwoloboff법	± 2.0 K(최대 600 K까지)
광전지 검출법 (Photocell detection)	± 0.3 K(373 K에서)
시차열분석 (DTA : Differential thermal analysis)	± 0.5 K(최대 600 K까지) ± 2.0 K(최대 1,273 K까지)
시차주사열량계 (DSC : Differential scanning calorimetry)	± 0.5 K(최대 600 K까지) ± 2.0 K(최대 1,273 K까지)

1) 이 정밀도는 ASTM D1120-72에서 설명한 것과 같은 간단한 장치에 적용된다. 더 정교한 끓는점 측정기(Ebulliometer)일수록 정밀도가 더 높다.

2.2 동적방법(Dynamic method)

본 시험법은 액체가 끓는 동안 환류 장치 내 수증기 재응축 온도를 측정하는 방법이다. 이때 압력이 변할 수 있으므로 101.325 kPa에서의 끓는점으로 표기한다. 장치는 그림 1과 같다.

2.3 증류법(Distillation method)

액체를 증류하여 수증기 재응축 온도 및 증류액 양을 측정하는 방법으로 장치는 ISO 918-1983(주 3)을 참고한다.

2.4 Siwoloboff법

2.4.1 장치 및 기구

그림 2에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 액상중탕장치는 튜브 내에 시료와 모세관을 넣는 것을 제외하고는 제2항의 “녹는점/녹는범위 시험”의 그림 1과 유사하다. 예상되는 시험물질의 끓는점 온도에 따라 중탕장치 내 액체의 종류를 선택한다. 573 K까지는 실리콘 기름을 사용할 수 있고 473 K까지는 액체 파라핀만 사용할 수 있다. 시료관의 직경은 약 5 mm이며 모세관은 시험관 아래쪽 끝 1 cm 정도 위에 위치하도록 고정한다. 모세관의 고정된 부분은 시료보다 아래에 위치하여야 한다.

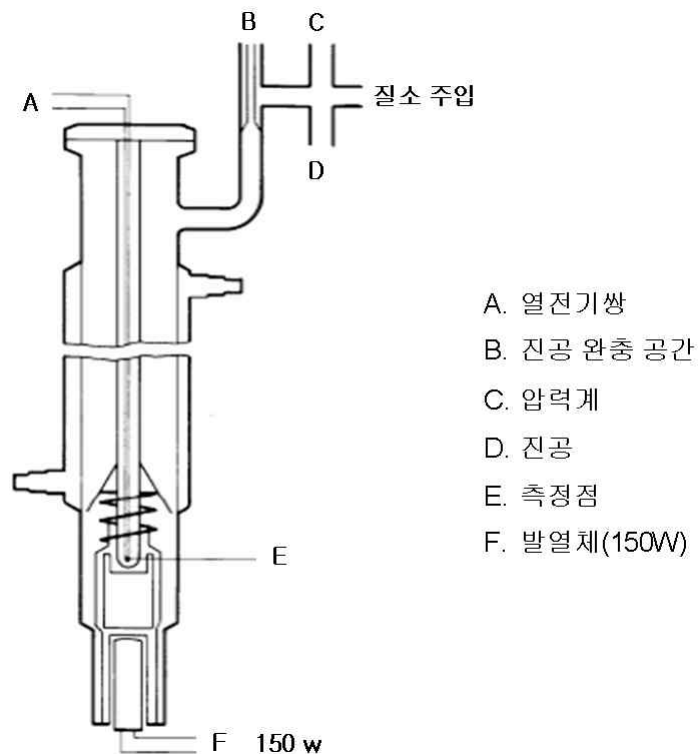


그림 1. 동적방법의 장치도

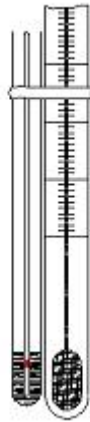


그림 2. Siwoloboff법의 장치도

2.4.2 시험절차

온도가 분당 3 K씩 상승하도록 중탕 장치를 가열한 뒤 교반한다. 예상되는 끓는점의 10 K 이하에 도달하면 온도가 분당 1 K 이하로 상승하도록 약하게 가열한다. 끓는점에 근접하면 모세관에서 기포가 빠르게 생성된다. 끓는점은 순간적인 냉각으로 기포 발생이 중단되고 모세관에서 액체가 갑자기 끓어오르는 온도이다.

2.5 광전지 검출(Photocell detection)

본 시험법의 장치는 제2항 “녹는점/녹는범위 시험법” 내 2.2 금속블록장치 내 모세관법의 장치에 제시되어 있다. 시험물질을 채운 모세관을 가열된 금속 블록 내에 장착한다. 광선은 시료를 통해 광전지로 향하게 한다. 끓는점에 도달하면 모세관에서 거품이 발생해 광전지에서 받은 빛의 강도가 약해진다. 광전지가 디지털 표시기에 정지 신호를 보내게 되고 블록에 위치한 저항 온도계로 측정된 온도가 표시된다.

2.6 시차열분석(DTA : Differential thermal analysis)

동일한 온도 조절 프로그램으로 조절된 시험물질과 표준물질 사이의 온도 차를 기록한다. 시험물질이 엔탈피 값 변화(끓는 경우, 흡열반응)를 수반한 상전이를

할 때 온도 기록 기준선을 벗어나는 것으로 그 변화를 알 수 있다. 시험장치 및 자세한 시험절차는 주 3을 참조한다.

2.7 시차주사열량계(DSC : Differential scanning calorimetry)

시험물질과 표준물질에 동일한 온도 조절 프로그램을 사용한다. 시험물질과 표준 물질을 똑같은 온도로 유지시키기 위해 필요한 입력 에너지 차이를 기록한다. 시험물질이 엔탈피 값 변화(끓는 경우, 흡열반응)를 수반한 상전이를 할 때 온도 기록 기준선을 벗어나는 것으로 그 변화를 알 수 있다. 시험장치 및 자세한 시험절차는 주 3을 참조한다.

3. 시험상의 유의사항

별도의 표준물질은 필요하지 않으며 검정용으로 사용되는 일부 표준물질은 주 3 표준 시험법 목록을 참조한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

끓는점은 최소 2 개 이상 측정값의 평균값으로 측정기압과 함께 기록하며 가급적이면 상압에 가까운 압력에서 측정한다. 최대 ± 5 kPa 정도의 표준 기압 편차에서 Sidney young식을 이용하여 측정 끓는점을 표준 끓는점으로 환산할 수 있다.

$$T_n = T + (f_T \times \Delta p)$$

여기에서, $\Delta p = 101.325 - p$

p = 압력(kPa)

f_T = 압력에 따른 끓는점 변화율(K/kPa)

T = 측정 끓는점(K)

T_n = 표준 끓는점(K)

보정계수 f_T 및 식은 주 3 표준 시험법 목록에 수록되어 있다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 측정에 사용된 방법

(2) 시험물질의 특성 및 불순물

(3) 정확도

(4) 끓는점

(5) 결과 해석과 관련된 정보 (불순물 및 물리적 상태 등)

- 주1) Le Neindre, B. and Vodar B., eds. (1975). IUPAC, Experimental Thermodynamics, Vol.II, Butterworths, London
- 주2) Weissberger, R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Vol. I, Part I, Chapter VII, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York.
- 주3) 표준 시험법 목록
1. 끓는점 측정기
 - (1) ASTM D 1120-72 : 부동액의 끓는점 측정 표준 시험법
 2. 증류법(끓는점 범위)
 - (1) BS 4349/68 : 석유제품의 증류 측정법
 - (2) BS 4591/71 : 액체 유기물의 증류 측정법
 - (3) DIN 53171 : Lösungsmittel für Anstrichstoffe, Bestimmung des Siedeverhaltens
 - (4) ISO 918:1983 : 산업용 액체 유기물의 증류 측정법
 - (5) JIS K 00-66 : 화학제품의 증류 측정법
 - (6) NF T 20-608 : Distillation: détermination du rendement et de l'intervalle de distillation
 3. 시차열분석 및 시차주사열량계
 - (1) ASTM E 472-86 : 열분석 자료 보고를 위한 표준 실험
 - (2) ASTM E 473-85 : 열분석 관련 표준 용어 정의
 - (3) ASTM E 537-76 : 시차열법분석법을 이용한 화학물질의 열안전성 평가 표준 시험법
 - (4) DIN 51005 : Thermische Analyse (TA)

제4항 물용해도 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 물에서 안정하면서 비휘발성인 순수한 화학물질의 물용해도를 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 물용해도 : 주어진 온도에서 물에 녹는 물질의 포화 질량 농도

2.2 물용해도는 용액 부피당 용질의 질량으로 표시하며 SI 단위는 kg/m^3 이지만 일반적으로 g/L 가 사용된다.

II. 시험

물용해도는 시험물질이 불순물을 포함할 경우 상당한 영향을 받는다. 이 시험법은 물에 안정하고 비휘발성인 순수 화학물질의 물용해도 측정에 적용할 수 있는 두 가지 시험방법을 수록하고 있다. 10^{-2} g/L 이하의 물용해도를 갖는 물질은 컬럼 용리법(Column elution method)을, 10^{-2} g/L 이상의 물용해도를 갖는 물질은 플라스크법(Flask method)을 적용한다.

본 시험을 수행함에 있어서 시험물질의 구조식, 증기압, 해리상수, pH별 가수분해 등과 같은 기본 자료는 시험에 유용한 정보로써 사용될 수 있다.

1. 시험방법

1.1 시험조건

시험은 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 수행하도록 한다. 이 온도는 시험과 관련된 모든 장비에서 항상 일정하게 유지되어야 한다.

1.2 예비시험

유리마개가 달린 10 mL 메스실린더에 약 0.1 g의 시험물질(고체인 경우 반드시 분쇄해야 함)을 넣고 아래 <표>과 같이 물을 가한 후 10 분 동안 강하게 흔들어 준 다음 시험물질 중에 녹지 않은 부분이 있는지 눈으로 확인한다. 만약 물 10 mL를 첨가한 후에도 시료 혹은 시료의 일부분이 아직도 용해되지 않고 남아있는 경우, 100 mL 메스실린더에 옮겨 시험을 계속한다. 시료가 완전히 용해되는데 필요한 물의 부피에 따른 대략적인 용해도가 <표>에 제시되어 있다. 용해도가 낮은 시험물질의 경우 용해되는데 오랜 시간이 걸릴 수 있으며 최소 24 시간이 소요될 수 있다. 24 시간 후에도 시험물질이 용해되지 않으면 최대 96 시간까지 기다리거나 칼럼 용리법이나 플라스크법 중 어떤 방법을 사용할지를 결정하기 위해 좀 더 희석한다.

<표> 용해도 예측을 위한 예비시험

0.1 g 용해에 필요한 물의 양(mL)	0.1	0.5	1	2	10	100	100 이상
대략적인 용해도 (g/L)	1,000 이상	1,000 ~ 200	200 ~ 100	100 ~ 50	50 ~ 10	10 ~ 1	1 이하

1.3 컬럼 용리법

1.3.1 원리

본 시험방법은 과량의 시험물질로 코팅한 불활성 지지체로 충전된 마이크로 컬럼으로부터 물을 이용하여 시험물질을 분리하는 방법이다(주 1). 물용해도는 시간의 함수로 물용해도가 일정한 값에 도달하였을 때 용출액의 질량농도로 표시된다.

1.3.2 장치 및 기구

항온 조건이 유지되는 마이크로 컬럼의 장치도는 그림 1과 같다. 마이크로 컬럼은 재순환 펌프(그림 2) 또는 액위조(Levelling vessel)와 연결된다. 마이크로 컬럼 속에는 불활성 지지체가 들어있으며 유리섬유 마개로 고정되어 있다. 이때

유리섬유 마개는 입자가 빠져나가는 것을 방지하는 역할도 병행한다. 불활성 지지체로는 유리구슬, 규조토 또는 기타 불활성 물질을 사용할 수 있다.

그림 1의 마이크로 컬럼은 재순환 펌프에 연결하는데 적합하게 제작되어 있다. 마이크로 컬럼 상부에는 충전 부피의 5 배(시험 초기에 제거됨)와 시료 부피의 5 배에(시험 중 분석을 위해 회수됨) 해당하는 공간이 있다. 불순물과 함께 5 배 충전 부피를 제거하는 시험을 수행하는 동안 물을 가할 수 있다면 컬럼 크기는 더 작아질 수 있다.

컬럼은 비활성 재질의 관을 통해 25 mL/h의 유속 조절이 가능한 재순환 펌프에 연결되어 있다. 재순환 펌프로는 연동식 펌프 또는 멤브레인 펌프 등이 사용될 수 있다. 관으로 인해 오염이나 흡착이 발생하지 않도록 주의하여야 한다.

그림 3에는 액위조를 사용한 모식도가 제시되어 있다. 여기에서 마이크로 컬럼은 단방향 잠금장치로 액위조까지는 비활성 재질의 관과 유리관 이음(Ground glass joint)으로 연결되어 있으며 유속은 대략 25 mL/h이 되어야 한다.

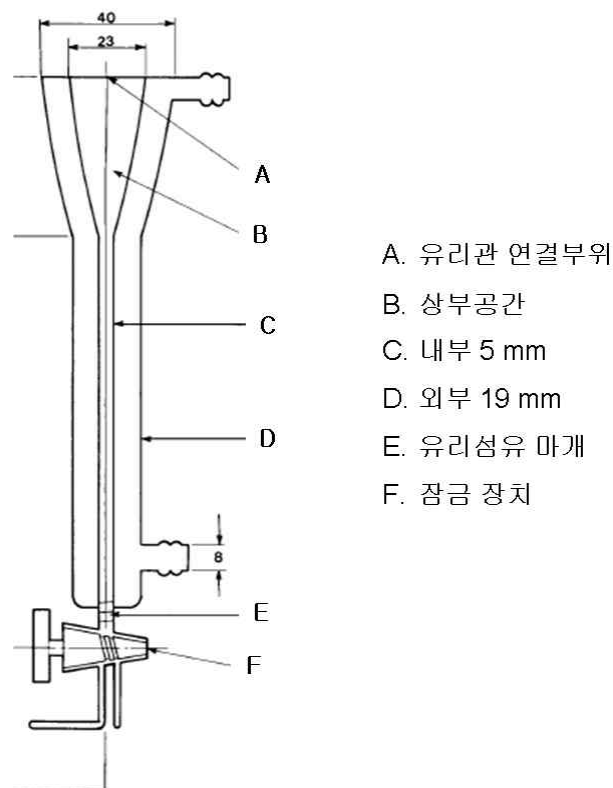


그림 1. 마이크로 컬럼의 장치도

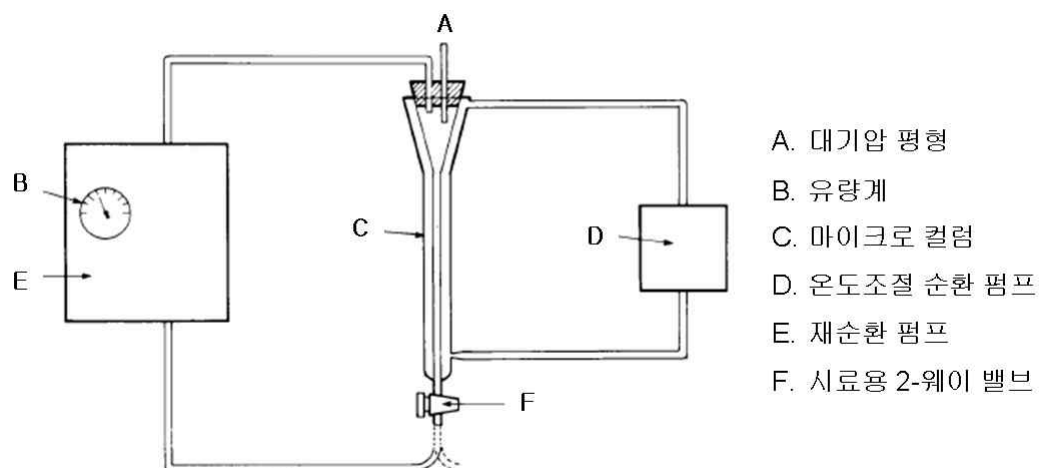


그림 2. 마이크로 컬럼과 재순환 펌프의 연결 예시

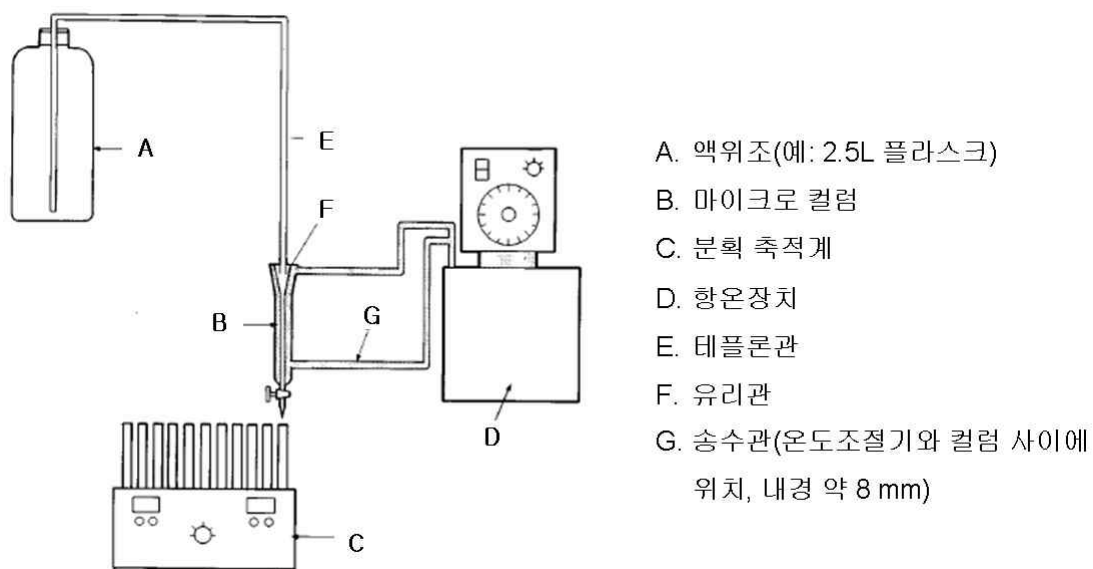


그림 3. 마이크로 컬럼과 액위조의 연결 예시

1.3.3 지지체 충전

약 600 mg의 지지체를 50 mL 둥근바닥 플라스크에 넣는다. 적당량의 시험물질을 휘발성 용매(분석시약용 등급)에 녹이고 이 용액 적당량을 지지체에 첨가한다. 휘발성 용매는 회전식 증발기를 이용하여 완전히 증발시키며 용매가 완전히 증발되지 않으면 표면이 분할되어 용리단계에서 지지체의 물 포화가 이루어지지 않으므로 주의한다. 충전된 지지체를 약 5 mL의 물에 2 시간 동안 담가둔 뒤, 이 현탁액을 마이크로 컬럼에 붓는다. 또는 건조한 지지체를 물이 채워진 마이크로 컬럼에 넣고 평형에 도달할 때까지 2 시간 동안 기다린다.

지지체의 충전이 잘못되어 되어 잘못된 시험 결과를 야기할 수 있으므로(예 : 시험물질이 기름의 형태로 떨어지는 경우) 이러한 경우는 충분히 조사하여 상세히 보고되어야 한다.

1.3.4 시험절차

(1) 재순환 펌프를 사용할 경우

컬럼을 통해 물을 흘려보내기 시작하며 이 때 유속은 25 mL/h가 적당하다. 이는 앞서 설명한 컬럼에 대해 시간당 충전 부피의 10 배에 해당한다. 순환이 시작되면 수용성 불순물을 제거하기 위해 최소한 처음 5 개 충전 부피는 버려야 한다. 그런 다음, 평형상태(5 개 연속적인 시료의 농도 편차가 $\pm 30\%$ 이상 나지 않는 상태)에 도달할 때까지 펌프를 가동한다. 시험물질은 최소 충전 부피의 10 배에 해당하는 공간을 통과하는데 상응하는 시간 간격으로 분리되어야 한다. 사용하는 분석 방법에 따라 평형상태에 도달했다는 것을 보여주는 농도/시간 곡선을 만드는 것이 좋다.

(2) 액위조를 사용할 경우

연속적으로 분리된 용출액 분획을 모아 분석한다. 최소 5 개의 연속 분획에서 농도 차이가 $\pm 30\%$ 이상 나지 않는 중간 용출액 범위의 분획을 이용하여 용해도를 측정한다.

1.3.5 시험상의 유의사항

- (1) 용리제로는 2 차 증류수를 가장 많이 사용한다. 10 MΩ/cm 이상의 저항률을 가지고 총 유기탄소 함유량이 0.01 % 이하인 탈이온수도 용리제로 사용할 수 있다.
- (2) 재순환펌프를 사용하는 방법과 액위조를 사용하는 방법 모두 두 번째 시험은 처음 액량의 반으로 수행한다. 두 시험의 결과가 일치하면 시험은 성공적으로 수행된 것이다. 액량을 반으로 낮추어 시험했을 때의 용해도 측정치가 높게 나올 경우 다시 액량을 반으로 줄여 시험을 수행하고 연속적으로 같은 용해도 측정값이 나올 때까지 반복 시험한다.
- (3) 틸들효과 검사법을 사용하여 분획에 콜로이드 물질이 존재하는지 여부를 검사해야 한다. 콜로이드가 있으면 시험 결과가 부정확하므로 컬럼의 필터 효과를 높여 재시험을 실시하여야 한다.
- (4) 각 시료의 pH를 측정한다.

1.4 플라스크법

1.4.1 원리

시험물질(고체인 경우 분쇄시켜야 함)을 시험 온도보다 약간 높은 온도에서 물에 용해시킨다. 포화상태에 도달하면 혼합물을 냉각시켜 시험 온도로 유지시킨다. 포화평형에 도달한 적절한 샘플링이 확인되면 시험 온도에서 직접 측정할 수도 있다. 그 후, 완전히 녹은 것으로 확인된 수용액 상태에서 시험물질의 질량농도를 적절한 분석방법으로 측정한다(주 2).

1.4.2 장치 및 기구

- (1) 실험용 유리제품 및 장비
- (2) 항온이 유지되는 교반장치
- (3) 원심분리기(가급적이면 온도조절이 가능한) : 에멀전용
- (4) 분석 장비

1.4.3 시험절차

예비시험을 통해 원하는 양의 물을 포화시키는데 필요한 시험물질의 양을 결정한다. 유리마개가 달린 유리용기 3 개에 각각 시험물질을 넣고 뚜껑을 닫은 후 5 회씩 무게를 측정한다. 선택한 양의 물을 각 용기에 넣는다. 용기를 마개로 막고 30 ℃에서 교반한다. 이때 항온 수조 내에 설치된 자석 교반기와 같이 항온 유지 기능이 있는 교반 장치를 사용한다. 하루가 지난 뒤, 시험용기 중 하나를 꺼내어 가끔씩 흔들어주어 시험 온도에서 24 시간 동안 평형상태가 되도록 한다. 그런 다음 내용물을 시험 온도에서 원심분리 시킨 후, 적당한 분석법을 이용하여 투명한 액상에 존재하는 시험물질의 농도를 측정한다. 나머지 두 개 용기도 각각 2 일, 3 일간 30 ℃에서 초기 평형상태에 도달하도록 한 뒤 같은 방법으로 처리한다. 마지막 두 용기에서 측정한 시험물질의 농도 편차가 15 % 이하이면 만족할 만한 시험을 수행한 것이다. 만약 용기 1, 2, 3에서 얻은 측정값이 증가하는 경향을 보이면 평형에 이르는 시간을 늘려서 전체 시험 과정을 반복해야 한다. 시험을 수행할 때 30 ℃에서 미리 항온처리 하지 않아도 된다. 포화 평형 속도를 추정하기 위해서 측정 농도에 영향을 주지 않을 정도로 교반 시간을 조절한다. 각 시료의 pH를 측정한다.

1.5 분석

용해도 측정에 있어서 소량의 수용성 불순물도 시험결과에 큰 오차를 일으킬 수 있으므로 물질의 특성에 따라 적절한 분석법(예 : 기체 크로마토그래피, 액체 크로마토그래피, 적정, 광도측정법, 전압전류법 등)을 사용한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 컬럼 용리법

각 시험별로 포화 정점에서 취할 수 있는 최소 5 개 이상의 연속적인 시료의 평균값과 표준편차를 계산해야 한다. 다른 액량에서 수행된 2 번의 시험에서 얻어진 평균값의 편차가 30 % 이상이면 안 된다.

1.2 플라스크법

3 개의 플라스크로부터 얻어진 측정값들의 편차가 15 % 이하인 값들의 평균값을 구한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과

2.5.1 컬럼 용리법

(1) 예비시험 결과

(2) 시험물질의 특성 및 불순물 (필요한 경우 예비정화 단계)

(3) 각 시료의 농도, 유량 및 pH

(4) 각 실험의 포화 정점에서 최소 5 개 이상 시료의 평균 및 표준 편차

(5) 최소 2 회 이상 연속 실험 평균값

(6) 포화과정 동안의 수온

(7) 분석방법

(8) 지지체의 특성

(9) 지지체의 충전에 대한 정보

(10) 사용된 용매

(11) 시험 중 시험물질의 화학적 불안정성에 대한 근거

(12) 결과 해석과 관련된 정보 (불순물 및 물질의 물리적 상태 등)

2.5.2 플라스크법

- (1) 예비시험 결과
- (2) 시험물질의 특성 및 불순물 (필요한 경우 예비정화 단계)
- (3) 각 플라스크에 대한 분석법 및 1 개 이상의 측정값에 대한 평균치
- (4) 각 시료의 pH
- (5) 각 플라스크에서 얻은 값의 평균치
- (6) 시험온도
- (7) 분석방법
- (8) 시험 중 시험물질의 화학적 불안정성에 대한 근거
- (9) 결과 해석과 관련된 정보 (불순물 및 물질의 물리적 상태 등)

- 주1) NF T 20-045 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of water solubility of solids and liquids with low solubility - Column elution method
- 주2) NF T 20-046 (AFNOR) (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of water solubility of solids and liquids with high solubility - Flask method

제5항 증기압시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 다양한 방법을 통해 화학물질의 증기압을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 증기압

고체나 액체물질의 포화압력

2.2 증기압에서 온도 단위는 켈빈온도(K)로 나타내며, 섭씨온도(°C)를 켈빈온도로 전환하는 식은 다음과 같다.

$$T = t + 273.15$$

여기에서, T : 켈빈온도(K)

t : 섭씨온도(°C)

2.3 압력의 단위는 파스칼(Pa)을 사용하며 다음의 환산식이 사용된다.

$$1 \text{ Torr} = 1 \text{ mmHg} = 1.333 \times 10^2 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ atm} = 1.013 \times 10^5 \text{ Pa}$$

$$1 \text{ bar} = 10^5 \text{ Pa}$$

II. 시험

열역학적 평형상태에서 순수한 물질의 증기압은 온도의 함수이다. 일반적으로 증기압은 여러 온도에서 측정되는데 Clapeyron-clausius식에 따라 제한된 온

도 범위 내에서 순수한 물질의 'log 증기압'은 열역학적 온도와 반비례한다. 자세한 기초원리는 주 1과 2에 수록되어 있다.

$$\log P = \frac{\Delta H_v}{2.3RT} + \text{상수}$$

여기에서, P = 물질의 증기 압력(단위 : Pa)

ΔH_v = 증발열(단위 : J/mol)

R = 보편 기체 상수(단위 : 8.314 J/mol · K)

T = 열역학적 온도(단위 : K)

10^{-10} 에서 10^5 Pa에 이르는 광범위한 범위의 증기압을 하나의 시험방법으로 측정할 수는 없다. 본 시험법에는 다양한 증기압 범위를 갖는 화학물질에 적용할 수 있는 8 개 증기압 측정 방법이 수록되어 있다. <표>에 각 시험 방법의 적용 및 권장 측정 범위 등이 비교되어 있다. 이 방법들은 시험 조건하에서 분해되지 않는 화합물에서만 적용할 수 있다. 기술적인 이유로 시험 방법을 적용할 수 없는 경우에 증기압은 계산으로 산출할 수 있으며 <부록>에 산출방법을 기술하고 있다.

1. 시험방법

1.1 동적 방법(코트렐 시험법)

1.1.1 원리

증기압은 약 10^3 에서 10^5 Pa 사이의 특정 압력에서 물질의 끓는점을 측정함으로써 결정된다. 본 시험법은 끓는점 측정에도 사용되는 방법으로 끓는점이 최대 600 K인 물질까지 적용할 수 있다. 액체의 끓는점은 액체 컬럼의 정수압으로 인해 표면으로부터 3 cm ~ 4 cm 아래 위치에서 약 0.1 °C 정도 높게 나타난다. 코트렐 시험법(주 3)에서 온도계는 액체의 표면 위 증기에 위치하며 끓는 액체는 온도계의 수은구 위로 연속적으로 올라가도록 되어있다. 대기압 하에서 증기와 평형상태인 얇은 액체막이 수은구를 덮으므로 온도계 과열이나 정수압으로 인

해 발생하는 오차 없이 정확한 끓는점을 읽을 수 있다. 그림 1에 코트렐에 의해 최초로 고안된 펌프의 모식도가 제시되어 있다. 관 A는 끓는 액체를 담고 있고 바닥에 봉하여진 백금 철사 B는 액체가 균일하게 끓을 수 있도록 도와준다. 측관 C는 냉각기로 연결되고 덮개 D는 차가운 응축액이 온도계 E에 닿지 않도록 한다. 관 A에 들어있는 액체가 끓으면 깔때기로 모아진 기포와 액체는 펌프 F의 두 가로대(arm)를 통해 온도계 수은구 위로 떨어진다.

<표> 시험방법의 종류별 정확도 및 권장범위

측정 방법	물질		추정 반복성	추정 재현성	권장 범위
	고체	액체			
동적 방법 (Dynamic method)	낮은 녹는점	가능	1 % ~ 10 % (최대 25 %)	1 % ~ 10 % (최대 25 %)	$10^3 \text{ Pa} \sim 2 \times 10^3 \text{ Pa}$ $2 \times 10^3 \text{ Pa} \sim 10^5 \text{ Pa}$
정적 방법 (Static method)	가능	가능	5 % ~ 10 %	5 % ~ 10 %	$10 \text{ Pa} \sim 10^5 \text{ Pa}$ $10^{-2} \text{ Pa} \sim 10^5 \text{ Pa}$
Isoteniscope법	가능	가능	5 % ~ 10 %	5 % ~ 10 %	$10^2 \text{ Pa} \sim 10^5 \text{ Pa}$
분출법(Effusion method) 중기압 균형 측정법	가능	가능	5 % ~ 20 %	최대 50 %	$10^{-3} \text{ Pa} \sim 1 \text{ Pa}$
분출법(Effusion method) 크누센 셀 측정법 (Knudsen cell)	가능	가능	10 % ~ 30 %	-	$10^{-10} \text{ Pa} \sim 1 \text{ Pa}$
분출법(Effusion method) 등온 열중량 측정기 (Isothermal thermogravimetry)	가능	가능	5 % ~ 30 %	최대 50 %	$10^{-10} \text{ Pa} \sim 1 \text{ Pa}$
기체 포화법 (Gas saturation method)	가능	가능	10 % ~ 30 %	최대 50 %	$10^{-10} \text{ Pa} \sim 10^3 \text{ Pa}$
점성 진공법 (Spinning rotor method)	가능	가능	10 % ~ 20 %	-	$10^{-4} \text{ Pa} \sim 0.5 \text{ Pa}$

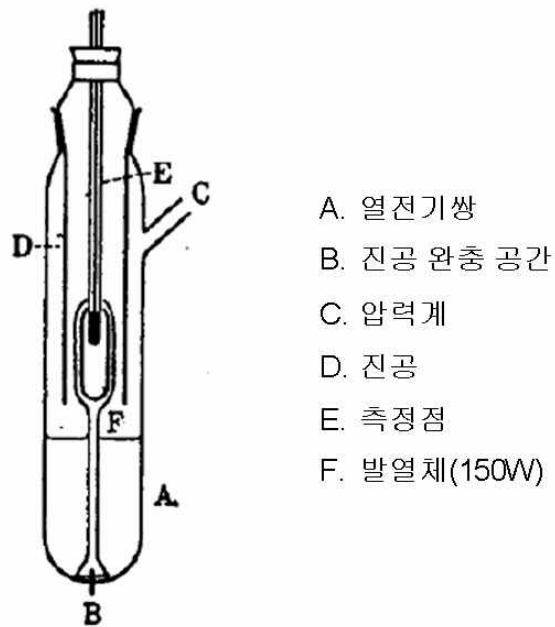


그림 1. 코트렐 펌프

1.1.2 장치 및 기구

코트렐의 원리에 따른 정교한 장치의 모식도가 그림 2에 제시되어있다. 이 장치는 아래쪽에 끓는 부분을 포함하는 관, 중간에 냉각 장치, 위쪽에 방출구와 플랜지(Flange)로 구성되어 있다. 코트렐 펌프는 전기 카트리지로 가열되는 끓는 부분에 위치한다. 온도는 열전기쌍(Jacketed thermocouple) 또는 위쪽 플랜지를 통해 삽입된 저항 온도계로 측정된다. 방출구는 압력 조절 장치에 연결되어 있다. 그밖에 진공 펌프, 진공 완충 공간, 압력 조절기로 질소를 방출하는 정압기(Manostat) 및 압력계(Manometer)로 구성되어 있다.

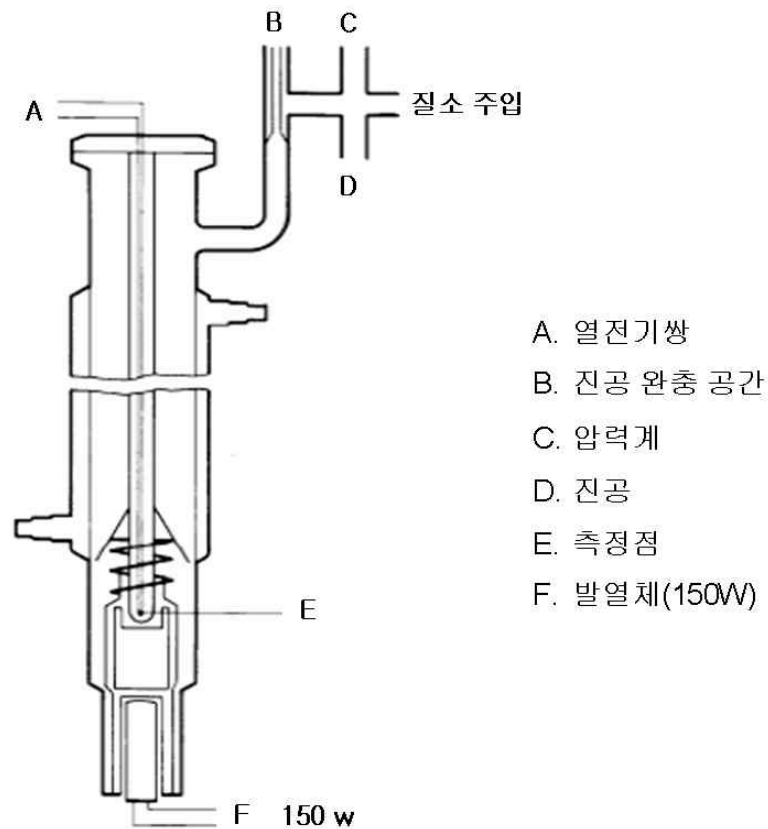


그림 2. 동적 방법의 장치도

1.1.3 시험절차

시험물질을 코트렐 장치의 끓는 부분에 넣는다. 분말 형태가 아닌 고체 시험물질의 경우 냉각 자켓을 가열시킨다. 장치의 테두리를 잘 밀봉하고 시험물질 중의 기체를 제거한다. 거품이 발생하는 물질의 증기압은 본 시험 방법에 의해서는 측정할 수 없다. 가장 낮은 압력에서 설치를 하고 가열을 시작한다. 동시에 온도 감지기를 기록계에 연결한다. 일정한 압력에서 끓는점이 일정하게 유지된다면 평형상태에 도달한 것이다. 끓는 동안 충격이 가해지지 않도록 주의해야하며 냉각기에서 완전히 응축이 일어나야 한다. 녹는점이 낮은 고체 시험물질의 증기압을 측정할 때에는 냉각기가 막히지 않도록 주의해야 한다.

평형점을 기록한 후 보다 높은 압력으로 시험을 수행한다. 압력이 10^5 Pa에 도달할 때까지 이 과정을 반복한다(전체적으로 약 5 개 ~ 10 개의 측정점을 둔다). 압력을 낮추면서 점검했을 때 평형점이 반복되어야 한다.

1.2 정적 방법

1.2.1 원리

정적 방법은 특정 온도에서 열역학적 평형상태의 증기압을 측정하는 방법이다(주 4). 본 시험법은 $10\text{ Pa} \sim 10^5\text{ Pa}$ 범위에서 다성분 액체 및 고체 시험물질에 적용할 수 있으며 주의를 기울인다면 $1\text{ Pa} \sim 10\text{ Pa}$ 범위에서도 적용할 수 있다.

1.2.2 장치 및 기구

그림 3에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 정적 방법의 장치는 항온조(정밀도 $\pm 0.2\text{ K}$), 진공관에 연결되는 시료 용기, 압력계 및 압력조절 장치로 이루어진다. 시료 챔버는 밸브와 영점 지표가 되는 시차압력계(적절한 압력계 유체가 들어있는 U자관)를 통해 진공관과 연결된다(그림 3A). 압력 범위 및 시험물질의 화학적 특성에 따라, 수은, 프탈레이트, 실리콘이 시차압력계 유체로 사용된다. 그러나 환경오염을 고려하여 가능하면 수은의 사용은 피하도록 한다. 시험물질이 U자관 내의 유체에 상당량 용해되거나 반응해서는 안 된다. U자관 대신 압력계를 사용할 수도 있다(그림 3B). 대기압 $\sim 10^2\text{ Pa}$ 범위에서는 수은을 사용할 수 있고, 실리콘 유체 및 프탈레이트는 10^2 이하에서 10 Pa 범위에서 사용할 수 있다. 10^2 Pa 이하의 범위에서 사용할 수 있는 압력계도 있으며 10^{-1} Pa 이하의 범위에서도 사용할 수 있는 가열성 막 압력계(Heatable membrane capacity manometer)도 있다. 온도는 시험물질이 들어있는 용기 외벽 또는 용기 자체에서 측정한다.

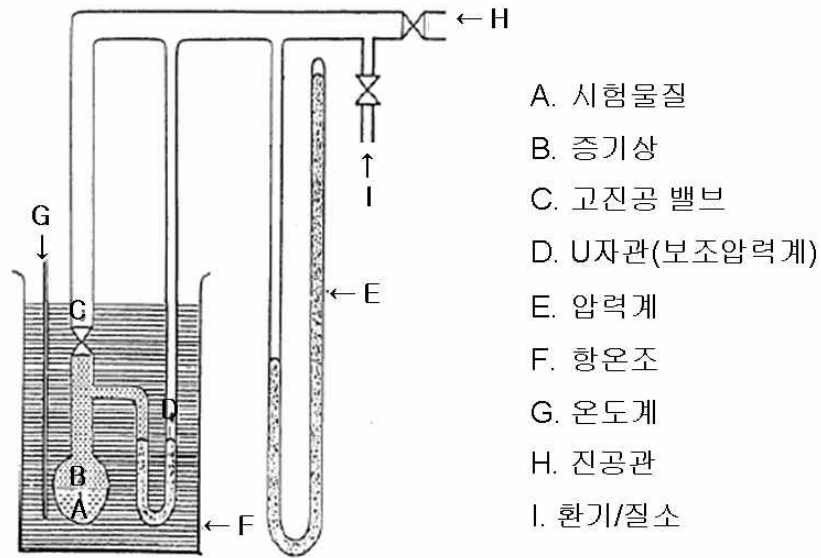


그림 3A. 정적 방법의 장치도

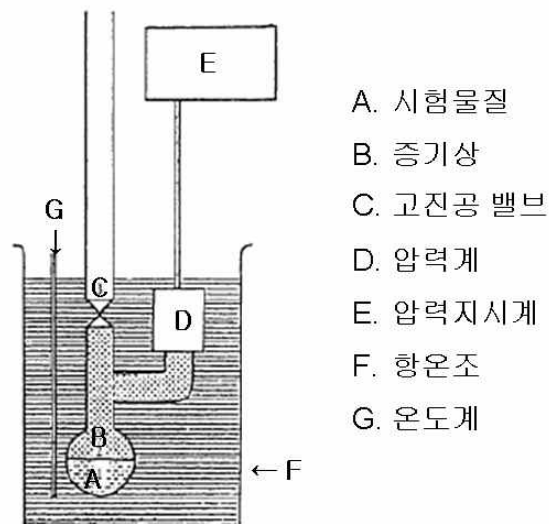


그림 3B. 정적 방법의 장치도

1.2.3 시험절차

시험물질의 특성에 따라 적절한 액체를 선택하고 그림 3A의 U자관에 액체를 채운다. 눈금을 읽기 전에 상승된 온도에서 가스를 제거한다. 시험물질을 장치에 넣고 낮아진 온도에서 가스를 제거한다. 다성분 시험물질인 경우 시험물질의 조성

이 변하지 않도록 충분히 낮은 온도에서 시험한다. 교반을 하면 보다 빨리 평형 상태에 도달할 수 있다. 시험물질을 액화질소 혹은 드라이아이스로 냉각시킬 수 있으나 공기나 펌프 유체의 응축이 일어나지 않도록 주의해야 한다. 시료 용기 위의 밸브를 열고 몇 분간 가스를 제거하고 필요하면 여러 번 반복해서 가스를 제거한다.

밸브를 잠근 상태에서 시험물질을 가열하면 증기압이 상승하여 U자관 안에 있는 유체의 평형상태가 깨지게 된다. 다시 평형상태를 이루기 위해, 차동 지압계가 '0'을 가리킬 때까지 질소 혹은 공기가 장치에 주입한다. 압력은 압력계 또는 보다 정밀한 장치로 읽을 수 있으며 이 압력이 측정온도에서 시험물질의 증기압에 해당한다. 그림 3B에 설명한 장치를 사용하면 직접 증기압을 읽을 수 있다.

원하는 최대 온도까지 적절한 세부 온도 구간으로 나누어(전체 약 5 개 ~ 10 개의 측정점) 증기압을 측정한다.

낮은 온도에서 측정할 경우 반복해서 압력값을 읽어야 한다. 반복 측정값이 온도 상승별 곡선과 일치하지 않으면 그 원인은 다음과 같다.

- (1) 시험물질에 공기가 포함되어 있거나(즉, 점성이 높은 물질인 경우) 시험물질의 끓는점이 낮아 가열하는 동안 소실되는 경우
- (2) 시험물질이 시험 온도 범위 내에서 분해나 중합반응과 같은 화학반응을 일으키는 경우

1.3 Isoteniscope법

1.3.1 원리

Isoteniscope법은 정적 방법의 원리에 기초한다(주 5). 항온이 유지되는 구형 용기에 시험물질을 넣고 압력계와 진공 펌프에 연결한다. 감압 하에서 가스를 제거하면 시험물질보다 휘발성이 높은 불순물들이 제거된다. 선택된 온도에서 시험물질의 증기압은 이미 알고 있는 불활성 가스의 압력과 균형을 이룬다. Isoteniscope법은 액체 탄화수소의 증기압을 측정하기 위해 개발되었지만 고체 시험물질의 증기압 측정에도 적용할 수 있다. 이 방법은 다성분 시험물질의 증

기압 측정에는 적합하지 않으며 비휘발성 불순물을 함유한 시료의 경우 결과에 미세한 오차가 발생할 수 있다. 권장범위는 $10^2 \text{ Pa} \sim 10^5 \text{ Pa}$ 이다.

1.3.2 장치 및 기구

측정 장치의 모식도가 그림 4에 제시되어 있으며 상세도는 주 5 (ASTM D 2879-86)에 제시되어 있다.

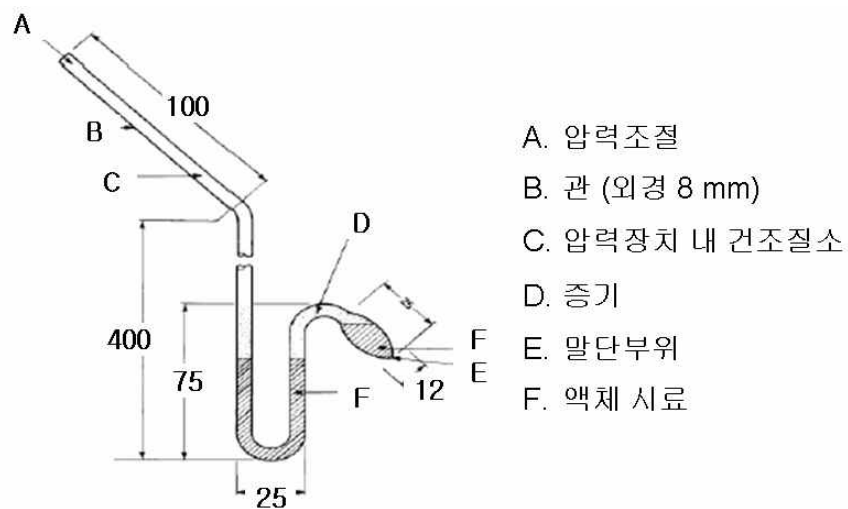


그림 4. Isotenoscope법의 장치도(단위 : mm)

1.3.3 시험절차

(1) 액체 시험물질

시험물질이 액체인 경우 시험물질 자체가 차동 압력계에서 유체 역할을 한다. 구형 시험용기와 압력계 U자관 부위를 채울 정도로 충분한 양의 시험물질을 넣는다. Isotenoscope를 진공 장치에 연결하여 진공시킨 후 질소를 충전한다. 잔여 산소를 제거하기 위해 이러한 진공화 단계를 2 회 반복한다. 구형 시험용기 및 압력계 내의 얇은 층으로 시험물질이 잘 퍼져나가도록 질소로 채우고 수평하게 놓는다. 이 장치의 압력을 133 Pa로 낮추고 용출된 가스가 제거되도록 시험물질이 끓기 시작할 때까지 서서히 가열한다. 다음에 시험물질이 구형 시험용기와 압력계 U자관 부위를 채울 수 있도록 조절한다. 압력을 133 Pa로 유지시킨다. 방출된 시험물질의 증기가 시험용기 상부와 압력계 가지관으로부터 압력

계를 치환시킬 정도로 충분히 팽창될 때까지 시험용기의 말단 부위를 약한 불로 가열시키면 질소 없이 증기로만 채워진 공간이 생긴다. 그런 다음 항온조에 넣고 질소의 압력이 시험물질의 압력과 같아지도록 조정한다. 평형에 도달하면 질소의 압력은 시험물질의 증기압과 동일하게 된다.

(2) 고체 시험물질

시험물질이 고체인 경우 압력 및 온도 범위에 따라 실리콘 혹은 프탈레이트와 같은 적절한 압력계 유체를 사용한다. 긴 가지관에 달린 불록한 부위로 탈가스와 시킨 압력계 유체를 주입한다. 그 다음에 시험물질을 시험용기에 넣고 온도를 높여 가스를 제거하고 압력계 유체가 U자관 안으로 흘러들어갈 수 있도록 기울인다.

1.4 분출법(증기압 균형 측정법)(주 6)

1.4.1 원리

시험물질을 진공상태인 종모양의 덮개 안에 놓인 작은 용해로에 넣고 가열한다. 용해로는 직경이 알려진 작은 구멍들이 있는 뚜껑으로 덮는다. 시험물질의 증기는 여러 개의 구멍 중 하나를 통해 빠져나와 고감도 저울로 보내지는데 이 저울 또한 진공상태의 종모양의 덮개로 덮여있다. 저울 접시(Balance pan)는 열전도를 통해 외부로 열이 분산되도록 냉동 박스(Refrigeration box)로 둘러싸여 있기도 하고 복사 냉각에 의해 그 위에 증기 응축이 일어나지 않도록 고안되기도 한다. 분출된 증기의 힘은 저울에서의 힘으로 나타난다. 증기압은 저울 접시에 작용한 힘으로부터 직접 구하거나 Hertz-knudsen 식(주 1)을 사용해 증발율로부터 구한다. 권장 범위는 10^{-3} Pa ~ 1 Pa 이다.

$$P = G \sqrt{\frac{2\pi RT \times 10^3}{M}}$$

여기에서, G = 증발률(단위 : kg/sec · m²)

M = 분자량(단위 : g/mol)

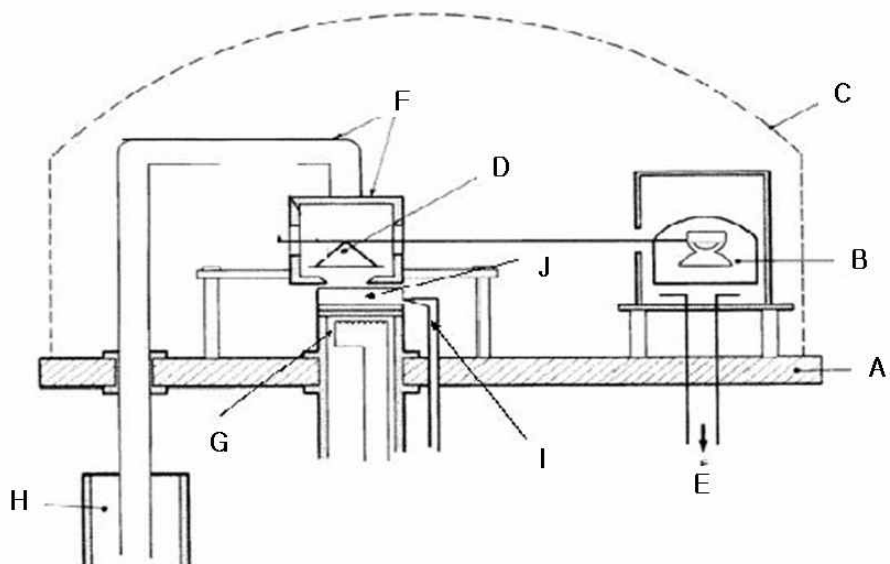
T = 온도(단위 : K)

R = 보편 기체 상수(단위 : 8.314 J/mol · K)

P = 증기 압력(단위 : Pa)

1.4.2 장치 및 기구

그림 5에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다.



- | | |
|---------------|-----------------------|
| A. 밑판 | F. 냉각박스 및 냉각바 |
| B. 이동코일장치 | G. 증발용해로 |
| C. 종모양 덮개 | H. 액체질소가 들어있는 듀어 플라스크 |
| D. 천칭접시 달린 저울 | I. 시험물질 온도측정 |
| E. 진공 측정 장치 | J. 시험물질 |

그림 5. 분출법(증기압 균형)의 장치도

1.5 분출법(크누센 셀 측정법)

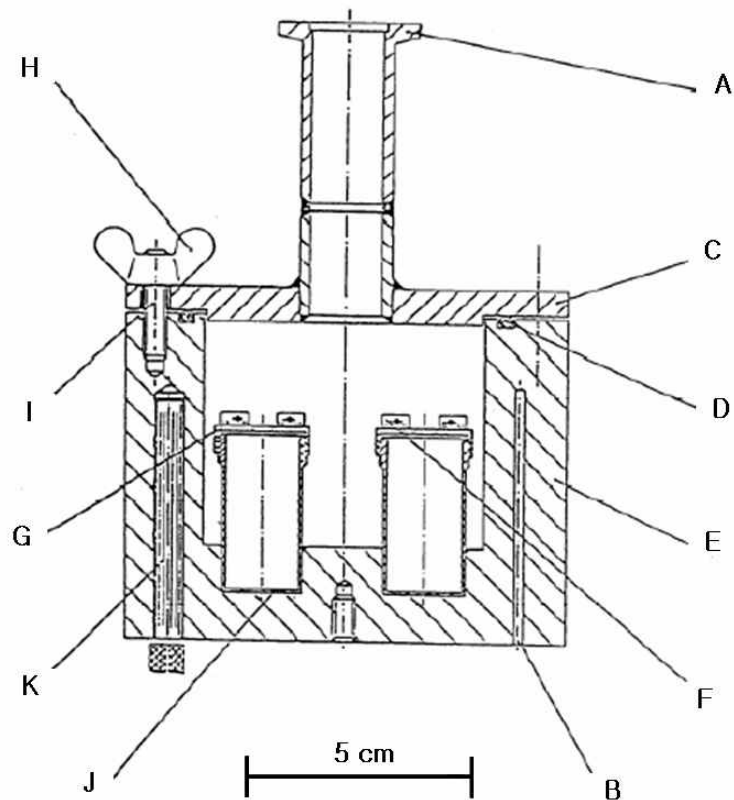
1.5.1 원리

이 방법은 초진공 상태에서 미세구멍을 통해 일정 시간 동안 증기의 형태로 크누센 셀(주 7) 밖으로 흘러나가는 시험물질의 추정 질량값에 근거한다. 유출된 증기의 질량은 크누센 셀 질량의 감소치를 측정하거나 낮은 온도에서 증기를 응축시켜 휘발된 시험물질의 양을 크로마토그래피로 측정함으로써 구할 수 있다. 각

장치별 매개변수에 따른 보정계수와 Hertz-knudsen식을 사용해 증기 압력을 계산한다(주 8). 권장 범위는 10^{-10} Pa ~ 1 Pa이다(주 9, 10, 11, 12, 13).

1.5.2 장치 및 기구

그림 6에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다.



- | | |
|---------------------------|-----------------------|
| A. 진공장치에 연결 | D. 유출셀 설치 및 제거 장치 |
| B. 백금 저항 온도계 또는 온도측정 및 조절 | G. 실 덮개(Threaded lid) |
| A. 진공탱크용 덮개 | H. 나비모양 너트 |
| B. O-ring | I. 볼트 |
| C. 알루미늄 진공탱크 | J. 스테인레스 유출 셀 |
| | K. 히터 카트리지 |

그림 6. 분출법(크누센 셀 측정법) 장치도

1.6 분출법(등온 열중량 측정법)

1.6.1 원리

본 시험법은 열중량 측정법(주 9, 주 14, 주 15, 주 16, 주 17, 주 18, 주 19)을 이용하여 상승된 온도 및 대기압에서 시험물질의 가속 증발 속도를 측정하는 방법이다. 시험물질을 천천히 흐르는 불활성 가스 압력에 노출시키고 적절한 시간 동안 한정된 등온 온도 $T(K)$ 에서 질량 손실을 관찰하여 증발률 v_T 를 구한다. $\log p_T$ 와 $\log v_T$ 의 선형관계를 이용해 v_T 값으로부터 증기압 p_T 을 계산한다. 필요하다면, $\log p_T$ vs $1/T$ 의 회귀 분석으로 20 °C 및 25 °C에서의 증기압을 추정할 수 있다. 측정된 질량 손실의 오역을 피하기 위해 본 시험법은 10^{-10} Pa (10^{-12} mbar)정도로 증기압이 낮고 순도가 100 %에 가까운 물질에 적용한다.

1.6.2 장치 및 기구

그림 7에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 항온 조절 챔버 내미량 저울 위에 달려있는 시료 이동판에 건조 질소 가스를 흘려보내면 시험물질에서 증발된 분자를 운반한다. 챔버를 그대로 놔두면 가스는 흡착 장치로 정화된다.

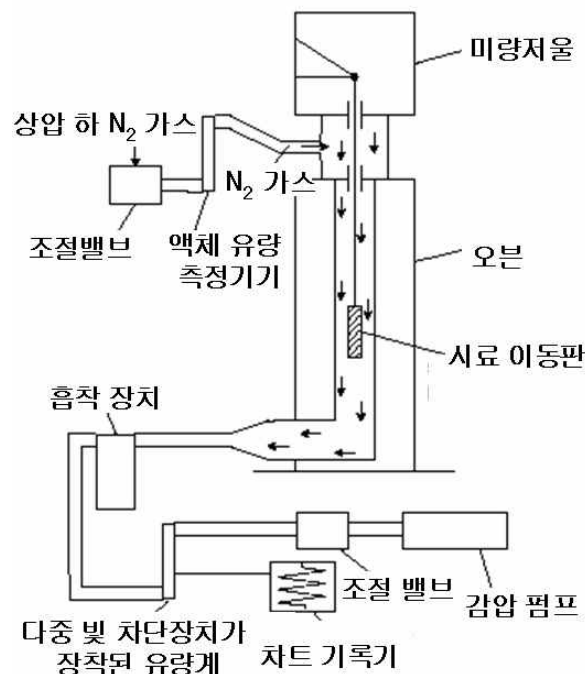


그림 7. 분출법(등온 열중량 측정법) 장치도

1.6.3 시험절차

거친 유리판 표면에 시험물질을 균일한 층으로 바른다. 고체인 경우, 시료판을 적당한 용매에 녹인 시험물질 용액으로 균일하게 적신 후 불활성 기체로 건조시킨다. 시험물질로 코팅된 시료판을 열 중량 분석기에 장착한 후 시간대별로 질량 손실을 계속해서 측정한다. 시료판의 질량 손실 Δm 으로부터 일정 온도에서의 증발률 v_T 를 계산한다.

$$v_T = \frac{\Delta m}{F \cdot t} (gcm^{-2}h^{-1})$$

여기에서, F : 코팅 처리된 시험물질의 표면적(보통은 시료판의 표면적)

t : 질량 손실 Δm 에 걸리는 시간

증발률 v_T 함수를 이용하여 다음 식으로부터 증기압 p_T 를 구한다. 여기서 'C'와 'D'는 사용된 시험 장치에 대한 특정 상수로 측정 챔버의 직경 및 기체 유속에 따라 달라진다. 이러한 상수값은 증기압을 알고 있는 화학물질의 증기압을 측정하여 $\log p_T$ vs $\log v_T$ 회귀 분석(주 10, 주 20, 주 21)으로 결정한다.

$$\log p_T = C + D \cdot \log v_T$$

증기 압력 P_T 와 온도 $T(K)$ 의 관계는 아래와 같다. 여기서, 'A' 및 'B'는 $\log P_T$ vs $1/T$ 회귀 분석으로 구할 수 있는 상수다. 이 식을 이용하여 다른 모든 온도에서의 증기압을 외삽법으로 추정하여 구할 수 있다.

$$\log p_T = A + B \cdot \frac{1}{T}$$

1.7 기체 포화법(주 22)

1.7.1 원리

일반적으로 상온에서 일정 유속의 불활성 가스를 시험물질 위 또는 내부로 통과시켜 충분히 포화되도록 한다. 일반적으로 흡착제를 사용하여 이동한 물질을 포집하고 그 양을 측정한다. 증기를 포집하여 분석하는 방법 대신 기체 크로마토그래피와 같은 In-train 분석법을 사용하여 이동한 물질의 양을 정량적으로 측정할 수도 있다. 이상기체방정식을 따르고, 기체 혼합물의 총 압력이 구성 기체 압력의 합과 같다는 가정 하에서 증기압을 계산한다. 이미 알고 있는 총 기체 부피와 이동한 물질의 무게로부터 시험물질의 분압, 즉 증기압을 구한다.

본 시험법은 증기압이 10^{-10} Pa(주 9, 주 10, 주 11, 주 12, 주 13) 이하인 고체 및 액체 시험물질에 적용할 수 있다. 이 방법은 10^3 Pa 이하의 증기압 측정에 적용하였을 때 가장 신뢰할 수 있으며 10^3 Pa 이상에서는 일반적으로 증기압이 과대 측정되는 경향이 있는데 이는 에어로졸의 생성에 의한 것으로 보인다. 증기압 측정은 상온에서 이루어지므로 고온에서 측정한 수치를 외삽할 필요는 없다. 고온에서 얻어진 수치로 외삽을 하게 되면 종종 심각한 오차가 생길 수 있으므로 피하는 것이 좋다.

1.7.2 장치 및 기구

그림 8에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 본 시험법은 항온 박스를 필요로 한다. 그림 8에 나타나 있는 것처럼 항온 박스에는 고체 혹은 액체 시료를 삼중 분석을 할 수 있도록 3 개의 고체 시료 홀더와 3 개의 액체 시료 홀더를 갖추고 있다. 온도는 ± 0.5 °C 내로 조절된다.

일반적으로 질소를 불활성 운반 가스로 사용하지만 가끔 다른 기체가 필요할 때도 있다(주 23). 운반 가스는 반드시 건조된 상태이어야 한다. 가스는 니들 밸브(직경 0.79 mm인 구멍)에 의해 조절되어 6 개의 방향으로 흐른다. 내경 3.8 mm의 구리 관을 통해 가스가 박스 안으로 흘러들어가게 한다. 온도가 평형상태에 도달한 후 가스는 시험물질과 흡착 트랩을 통과하여 항온 박스 밖으로 빠져나간다.

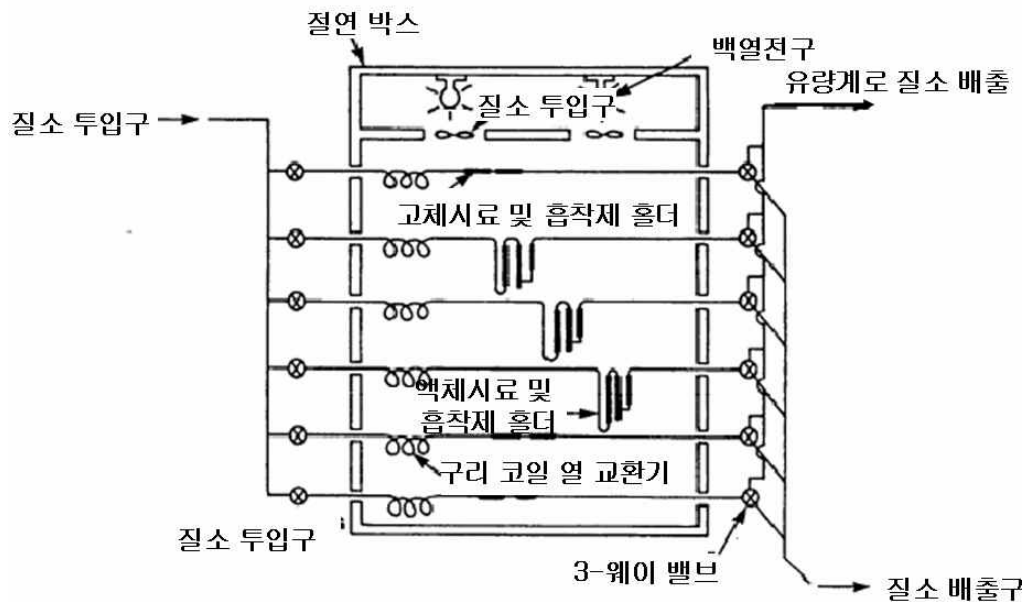


그림 8. 기체 포화법 장치도

고체 시험물질은 내경 5 mm의 유리관의 유리솜 사이에 충전 시킨다(그림 9). 그림 10에는 액체 시험물질 홀더와 흡착 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 액체의 증기압을 측정할 때 가장 재현성이 높은 방법은 유리구슬 혹은 실리카와 같은 불활성 흡착제 표면을 액체 시험물질로 코팅하고 이 유리구슬로 홀더를 충전 시키는 방법이다. 대체 방법으로는 운반 가스를 액체 시험물질 칼럼을 통해 굵은 프리트(Coarse frit)과 거품을 통과하도록 하는 방법이다.

흡착 장치는 전면 및 후면에 흡착 부위를 갖고 있다. 증기압이 매우 낮을 경우 소량만이 흡착제에 흡착되고 시료와 흡착제 사이의 유리솜과 유리관에 흡착이 되면 심각한 문제가 발생한다.

증발된 물질을 모으는 다른 효과적인 방법은 고체 이산화탄소(드라이아이스)로 냉각시킨 트랩을 이용하는 방법이다. 이 방법은 포화기 칼럼에서 역압(Back pressure)을 일으키지 않으며 모아진 물질을 정량적으로 제거하기 쉽다.

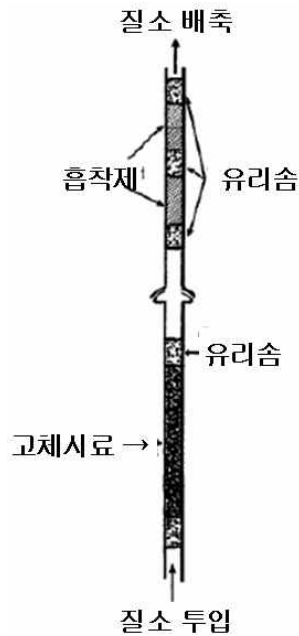


그림 9. 고체시료 홀더 및 흡착장치

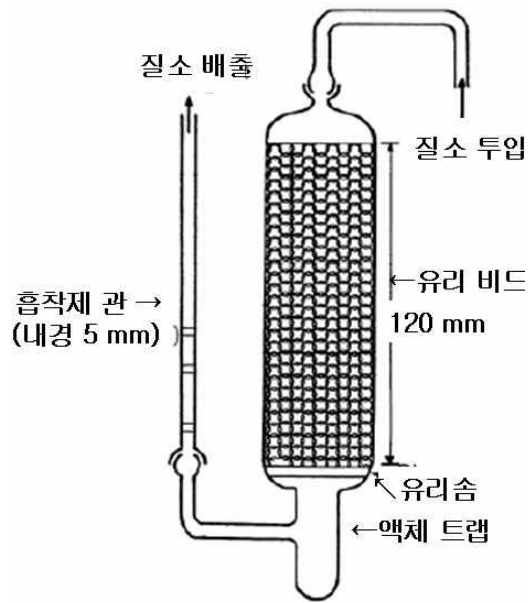


그림 10. 액체시료 홀더 및 흡착장치

1.7.3 시험절차

유출되는 운반 가스의 유속은 실온에서 측정한다. 운반 가스의 전체 부피를 정확히 알기 위해 시험 중 수시로 유속을 점검해야 한다. 질량 유량계로 계속 확인하는 것이 좋다. 가스상이 포화되려면 상당한 접촉 시간이 필요하므로 낮은 유속으로 가스를 흘려보내야 한다(주 24).

전면 및 후면의 흡착 부위를 분리하고 용매를 가하여 각 부위의 화합물을 탈착시킨 뒤 화합물 용액을 정량적으로 분석한다. 분석방법이나 흡착 및 탈착 용매는 시험물질의 특성에 따라 달라진다. 탈착효율은 이미 알고 있는 양의 시료를 흡착제에 주입·탈착시킨 뒤 회수된 양을 분석하여 결정한다.

운반 가스가 시험물질로 포화된다는 것을 확인하기 위해 3 가지 유속으로 시험을 수행한다. 계산된 증기압이 유속과 상관성이 없는 경우 이 운반 가스는 포화되었다고 본다. 증기 압력은 다음 식에 따라 계산한다.

$$P = \frac{W}{V} \times \frac{RT}{M}$$

여기에서, P = 증기 압력(단위 : Pa)

W = 증발된 시험 물질의 질량(단위 : g)

V = 포화된 기체 부피(단위 : m^3)

R = 보편 기체 상수(단위 : $8.314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$)

T = 온도(단위 : K)

M = 시험 물질의 몰 질량(단위 : g/mol)

측정된 부피는 유량계와 포화기 사이의 압력 및 온도 차에 대해 보정되어야 한다.

1.8 회전자법

1.8.1 원리

본 시험법은 회전자 점도계를 사용하는 방법이다. 회전자 점도계의 측정 장치는 소형 강철구로 되어있으며 이는 자기장 내에서 회전장에 의해 회전하도록 만들어져 있다(주 25, 주 26, 주 27). 픽업 코일(Pickup coil)로 회전을 측정한다. 강철구가 주어진 회전속도(일반적으로 초당 약 400 회전)에 도달하면 전류가 멈추고 가스 마찰로 인하여 감속이 발생한다. 회전속도 감소를 시간의 함수로 측정한다. 압력에 따른 강철구의 감속으로부터 증기압을 추정한다. 권장되는 범위는 $10^{-4} \text{ Pa} \sim 0.5 \text{ Pa}$ 이다.

1.8.2 장치 및 기구

그림 11에 장치에 대한 모식도가 제시되어 있다. 측정기의 상단부분은 항온 밀폐실에 위치하며 온도는 $\pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 이내로 조절한다. 시료 용기는 분리된 밀폐실에 위치하며 온도는 $\pm 0.1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 이내로 조절한다. 응축을 방지하기 위해 이 장치의 다른 모든 부분을 더 높은 온도로 유지한다. 전체 장치는 고진공 장치에 연결된다.

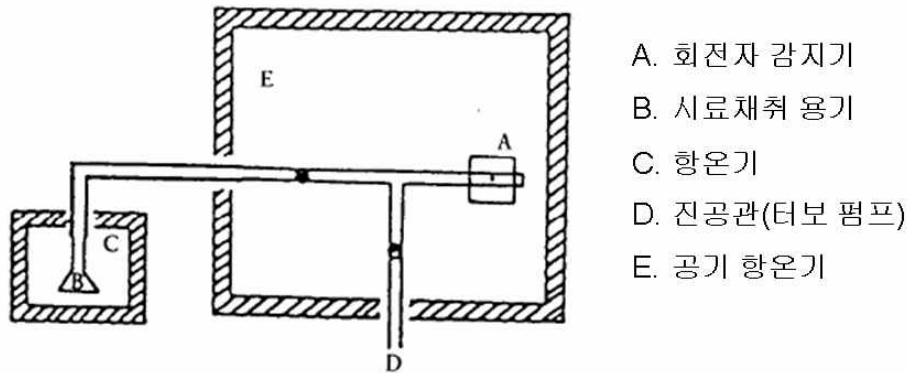


그림 11. 회전자법 장치도

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

모든 시험방법에서 증기압은 최소 2 개 이상의 온도에서 측정하여야 한다. 증기 압력 곡선의 선형 관계를 확인하기 위해서는 $0^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ 범위에서 3 개 이상의 온도를 측정하는 것이 좋다. 분출법(크누센 셀 측정법 및 등온 열중량 측정법)과 기체 포화법의 경우에는 $120^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$ 범위가 권장된다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 측정에 사용된 방법

(2) 시험물질의 특성 및 불순물(필요한 경우 예비정제 단계)

(3) $0^{\circ}\text{C} \sim 50^{\circ}\text{C}$ (또는 $120^{\circ}\text{C} \sim 150^{\circ}\text{C}$) 범위 내에서 최소 2 개 이상의 증기압 및 온도

- (4) 모든 시험 기초자료
- (5) $\log P$ vs $1/T$ 곡선
- (6) 20 °C 또는 25 °C에서의 증기압 추정값
- (7) 시험물질의 상태 변화나 분해와 같은 변화가 관찰될 경우, 아래와 같은 정보를 제시하여야 한다.
 - (a) 발생한 변화의 성질
 - (b) 대기압 하에서 변화가 발생할 때의 온도
 - (c) 전이온도 이하 10 °C, 20 °C에서의 증기압 및 전이온도 이상 10 °C, 20 °C에서의 증기압(고체에서 기체로 전이되는 경우에는 해당사항 없음)
- (8) 결과 해석과 관련된 정보(불순물 및 물리적 상태 등)

- 주1) Ambrose, D. (1975). Experimental Thermodynamics, Vol.II, Le Neindre, B., and Vodar, B., Eds., Butterworths, London.
- 주2) Weissberger R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Vol. I, Part I. Chapter IX, Interscience Publ., New York.
- 주3) Glasstone, S. (1946). Textbook of Physical Chemistry, 2nd ed., Van Nostrand Company, New York.
- 주4) NF T 20-048 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of vapour pressure of solids and liquids within a range from 10⁻¹ to 105 Pa - Static method.
- 주5) ASTM D 2879-86, Standard test method for vapour pressure - temperature relationship and initial decomposition temperature of liquids by isoteniscope.
- 주6) NF T 20-047 AFNOR (September 1985). Chemical products for industrial use - Determination of vapour pressure of solids and liquids within range from 10⁻³ to 1 Pa - Vapour pressure balance method.
- 주7) Knudsen, M. (1909). Ann. Phys. Lpz., 29, 1979; (1911), 34, 593.
- 주8) Ambrose, D., Lawrenson, I.J., Sprake, C.H.S. (1975). J. Chem. Thermodynamics 7, 1173.
- 주9) Schmuckler, M.E., Barefoot, A.C., Kleier, D.A., Cobranchi, D.P. (2000), Vapor pressures of sulfonylurea herbicides; Pest Management Science 56, 521-532.
- 주10) Tomlin, C.D.S. (ed.) (2000). The Pesticide Manual, Twelfth Edition.
- 주11) Friedrich, K., Stambach, K. (1964), Gas chromatographic determination of small vapour pressures determination of the vapour pressures of some triazine herbicides. J. Chromatog. 16, 22-28
- 주12) Grayson, B.T., Fosbraey, L.A. (1982). Pesticide Science 16, 269-278.
- 주13) Rordorf, B.F. (1987), Prediction of vapor pressures, boiling points and enthalpies of fusion for twenty- nine halogenated dibenzo-p-dioxins. Thermochimia Acta 112 Issue 1, 117-122.
- 주14) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R. (1973), A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection; Pesticide Science 4, 137-147.
- 주15) Gückel, W., Synnatschke, G., Ritttig, R. (1974), A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection II. Application to Formulated Products; Pesticide Science 5, 393-400.

- 주16) Gückel, W., Kaestel, R., Lewerenz, J., Synnatschke, G. (1982), A Method for Determining the Volatility of Active Ingredients Used in Plant Protection. Part III: The Temperature Relationship between Vapour Pressure and Evaporation Rate; Pesticide Science 13, 161-168.
- 주17) Gückel, W., Kaestel, R., Kroehl, T., Parg, A. (1995), Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part IV: An Improved Thermogravimetric Determination Based on Evaporation Rate; Pesticide Science 45, 27-31.
- 주18) Kroehl, T., Kaestel, R., Koenig, W., Ziegler, H., Koehle, H., Parg, A. (1998), Methods for Determining the Vapour Pressure of Active Ingredients Used in Crop Protection. Part V: Thermogravimetry Combined with Solid Phase MicroExtraction (SPME); Pesticide Science 53, 300-310.
- 주19) Tesconi, M., Yalkowsky, S.H. (1998), A Novel Thermogravimetric Method for Estimating the Saturated Vapor Pressure of Low-Volatility Compounds; Journal of Pharmaceutical Science 87(12), 1512-20.
- 주20) Lide, D.R. (ed.), CRC Handbook of Chemistry and Physics, 81st ed.(2000), Vapour Pressure in the Range -25°C to 150°C.
- 주21) Meister, R.T. (ed.) (2002). Farm Chemicals Handbook, Vol. 88.
- 주22) 40 CFR, 796. (1993). pp 148-153, Office of the Federal Register, Washington D.C.
- 주23) Rordorf B.F. (1985). Thermochimica Acta 85, 435.
- 주24) Westcott et al. (1981). Environ. Sci. Technol. 15, 1375.
- 주25) Messer G., Röhl, P., Grosse G., and Jitschin W. (1987). J. Vac. Sci. Technol. (A), 5(4), 2440.
- 주26) Comsa G., Fremerey J.K., and Lindenau, B. (1980). J. Vac. Sci. Technol. 17(2), 642.
- 주27) Fremerey, J.K. (1985). J. Vac. Sci. Technol. (A), 3(3), 1715.

<부록> 증기압 추정 방법

I. 개요

1. 증기압 추정값은 다음과 같은 경우에 사용할 수 있다.

1.1 적절한 실험 방법을 결정하고자 하는 경우

1.2 기술적인 이유로 실험 방법을 사용할 수 없을 때, 추정값 혹은 한계값을 제공하고자 하는 경우

II. 추정 방법

1. 변형된 Watson 상관관계식(a)을 이용하여 고체 및 액체의 증기압을 추정할 수 있다. 이때 필요한 시험값은 표준 끓는점 값이다. 이 방법은 $10^5 \sim 10^{-15}$ 사이의 압력 범위에서 적용할 수 있다.

2. 이 방법에 대한 상세한 설명은 “Handbook of chemical property estimation methods”^(b)에서 기술되어 있다. OECD Environmental monograph no. 67(c)도 참조할 수 있다.

III. 계산

1. 증기압은 다음과 같이 계산한다.

$$\ln P_{vp} = \frac{\Delta H_{vb}}{\Delta Z_b R T_b} \left(1 - \frac{\left(3 - 2 \frac{T}{T_b} \right)^m}{\frac{T}{T_b}} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_b} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_b} \right)$$

여기에서, T = 시험 온도

T_b = 표준 끓는점

P_{vp} = 온도 T 에서 증기 압력

ΔH_{vb} = 증발열

ΔZ_b = 압축 인자(추정값 : 0.97)

m = 시험 온도에서 물리적 상태에 따른 실험 인자

위 식은 더 나아가서

$$\frac{\Delta H_{vb}}{T_b} = K_F(8.75 + R \cdot \ln T_b)$$

여기에서, K_F = 물질의 극성을 고려하는 시험 인자

일부 화학물질에 대한 K_F 값은 참고(b)에 수록되어 있다.

2. 감압 하에서 끓는점 측정값이 주어지는 경우 다음과 같은 식으로 증기압을 계산할 수 있다.

$$\ln P_{VP} = \ln P_1 + \frac{\Delta H_{v1}}{\Delta Z_b R T_1} \left(1 - \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^m \frac{T_1}{T} - 2m \left(3 - 2 \frac{T}{T_1} \right)^{m-1} \ln \frac{T}{T_1} \right)$$

여기에서, T_1 = 감소한 압력 P_1 에서 끓는점

IV. 보고서

추정 방법을 사용할 때, 계산에 대한 포괄적인 설명을 보고서에 수록하여야 한다.

- (a) Watson, K.M. (1943). Ind. Eng. Chem, 35, 398.
- (b) Lyman, W.J., Reehl, W.F., Rosenblatt, D.H. (1982). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill.
- (c) OECD Environmental Monograph No.67 (1993). Application of Structure-Activity Relationships to the Estimation of Properties Important in Exposure Assessment.

제6항 고체 및 액체 밀도시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 다양한 방법을 통해 고체 및 액체 화학물질의 밀도를 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 밀도(ρ) : 물질의 질량과 부피의 비율

2.2 밀도에 대한 SI 단위는 kg/m^3 로 나타낸다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

시험장치에 대한 자세한 설명은 주 1의 표준목록에 수록되어 있다.

1.2 시험조건

시험은 항온 상태(가급적이면 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$)에서 수행하며 2 회 반복 측정한다.

2. 시험방법

2.1 원리

액체 및 고체의 밀도 측정법은 국제 표준화 대상으로 본 시험법에서는 이러한 표준 시험법들을 개략적으로 기술하고 있으며 자세한 내용은 표준시험법 목록을 참조하도록 한다(주 1). 본 시험법에서는 과학 전문지에서 발췌한 다른 밀도 측정법에 대해서도 간략히 기술하고 있다. 밀도 측정과 관련된 자세한 기본 원리는 주 2를 참조한다.

2.1.1 액체 비중계법(Hydrometer)

액체 비중계는 밀도에 따라 액체 속에 잠기는 정도가 달라지는 유리제 기구이다. 액체의 밀도는 액면에 접하는 관에 새겨진 눈금에서 액체의 위치를 읽어 측정한다. 이때 시험물질의 역학 점도(Dynamic viscosity)는 $5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 를 초과해서는 안 된다.

2.1.2 비중 천칭법/액체 및 고체 부력법(Hydrostatic balance/ a buoyancy method for liquids and solids)

(1) 고체 시험물질

밀도를 알고 있는 액체(물 등)에서 고체 시험물질의 무게를 측정하고 공기 중에서 시험물질의 무게를 측정하여 그 차이로부터 시험물질의 밀도를 계산한다. 이러한 방식으로 측정된 밀도는 특정 시료에 대한 대표치이다(벌크 밀도).

(2) 액체 시험물질

부피를 알고 있는 고체를 사용하여 공기 중에서 무게를 측정하고 액체 시험물질에 가라앉혀서 무게를 측정한다. 이때 측정하려는 역학 점도는 $5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 를 초과해서는 안 된다.

2.1.3 액체 부력법(Immersed body method, a buoyancy method for liquid)

본 시험방법은 액체 시험물질에 적용할 수 있다. 시험물질이 들어있는 용기를 저울에 올려 무게를 단다. 그 다음, 부피를 알고 있는 물체(일반적으로 금속으로 만든 10 cm^3 의 구)를 저울과 떨어져 있는 스탠드에 고정시키고 액체에 담근다. 액체의 밀도는 부피를 알고 있는 물체를 액체에 담갔을 때 증가하는 무게를 물체의 부피로 나눔으로써 알 수 있다. 물체가 액체에 잠긴 부위와 떠있는 부위가 저울에 미치는 작용은 구별할 수 없다. 물체가 액체에 떠있는 부위와 잠긴 부위의 부피 및 밀도는 동일하다. 이 방법은 역학 점도가 $20 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 이하인 액체에 적용할 수 있다(주 3).

2.1.4 비중계법(Pycnometer)

본 시험방법은 액체 및 고체 시험물질에 적용할 수 있다. 비중계가 가득 찼을

때와 비어 있을 때의 무게 차이와 비중계의 부피로부터 밀도를 구할 수 있다.
이 방법은 역학 점도가 $500 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 이상인 액체 시험물질에는 적용할 수 없다.

2.1.5 공기비교 비중계법(Air comparison pycnometer)

본 시험방법은 고체 시험물질에 적용할 수 있다. 공기 또는 불활성 가스 중에서 눈금 실린더로 시험물질의 부피를 측정한다. 그 다음에 시험물질의 무게를 측정하여 밀도를 구한다.

2.1.6 진동식 밀도계법(Oscillating densitometer)

본 시험방법은 액체 시험물질에 적용할 수 있다. U자관 형태의 기계 진동기는 질량에 따라 각각의 공명 주파수로 진동한다. 시험물질을 주입하면 공명 주파수가 변화한다. 밀도를 알고 있는 두 가지 액체를 사용하여 측정 장치를 보정한다. 이때 보정에 사용하는 액체의 밀도는 시험물질의 밀도를 포함하는 범위의 물질을 선택하는 것이 좋다. 이 방법은 역학 점도가 $5 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 이하인 액체 시험물질에 적용할 수 있다(주 4, 주 5, 주 6).

2.2 시험절차

시험절차에 대한 자세한 설명은 주 6의 표준목록에 수록되어 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

밀도는 추정 정확도 범위 내에서 최소 2 개 이상 측정값의 평균값으로 기록한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 측정에 사용된 방법

(2) 시험물질의 특성 및 불순물

(3) 추정 정확도

(4) 밀도

(5) 결과 해석과 관련된 정보(불순물 및 물리적 상태 등)

주1) 표준시험법 목록

1. 액체 비중계법(Hydrometer)

- (1) ASTM D 1298 : 액체 비중계를 이용한 원유 및 액체 석유 제품의 밀도, 비중 혹은 API 비중 측정법
- (2) BS 4714 : 액체 비중계를 이용한 원유 및 액체 석유 제품의 밀도, 비중 혹은 API 비중 측정법
- (3) DIN 12790 : Laborgeräte aus Glas; Aräometer. Grundlagen für Bau und Justierung
- (4) DIN 12791 : Laborgeräte aus Glas; Dichte-Aräometer. Allgemeine Anforderungen
- (5) DIN 12793 : Laborgeräte aus Glas. Sucharäometer für Vormessung und rohe Betriebs-messung
- (6) ISO 387 : 액체 비중계 - 구조 및 조절 원리
- (7) ISO 649-1 : 일반적 목적을 위한 밀도 비중계 - 사양
- (8) ISO 649-2 : 일반적 목적을 위한 밀도 비중계 - 시험 방법 및 사용법

2. 비중 천칭법(Hydrostatic balance)

2.1 고체물질

- (1) NF T 20-049 : 산업용 화학제품 - 가루 및 셀룰러(cellular) 제품 외 고체의 밀도 측정

2.2 액체물질

- (1) ASTM D 941-55
- (2) ASTM D 1296-67
- (3) ASTM D 1481-62
- (4) DIN 51757 : Prüfung von Mineralölen und verwandten Stoffen. Bestimmung der Dichte
- (5) ISO 758 : 액체 화학제품, 20 °C에서 밀도 측정법

3. 액체 부력법(Immersed body method)

- (1) DIN 53217 : Teil 3: Lacke, Austrichstoffe und ähnliche Beschichtungsstoffe, Bestimmung der Dichte. Tauchkörper-Verfahren

4. 비중계법(Pycnometer)

- (1) ISO 3507 : 비중계 측정법
- (2) NF T 20-053 : 산업용 화학제품(가루 상태의 고체 및 액체의 밀도 측정법)

4.1 액체물질

- (1) BS 4699 : 석유제품의 비중 및 밀도 결정법(눈금 이중모세관 비중계법)
- (2) BS 5903 : 모세관 마개 비중계법을 이용한 석유제품의 상대 밀도 및 밀도 측정법
- (3) DIN 12797 : Laborgeräte aus Glas. Pyknometer nach Gay-Lussac(점성이 크지 않는 비휘발성 액체)
- (4) DIN 12798 : Laborgeräte aus Glas. Pyknometer nach Lipkin (15 °C에서, 역학 점도가 10^{-4} m²/s 이하인 액체)
- (5) DIN 12806 : Laborgeräte aus Glas. Pyknometer nach Hubbard(증기압력이 크지 않은 모든 형태의 점성액: 특히 도료, 니스, 역청)
- (6) DIN 12809 : Laborgeräte aus Glas. Pyknometer mit eingeschliffenem thermometer und Seiten Kapillare(점성이 크지 않은 액체)
- (7) DIN 53217 : Teil 2: Lacke, Austrichstoffe und ähnliche Beschichtungsstoffe Bestimmung der Dichte. Pyknometer-Verfahren
- (8) ISO 758 : 산업용 액체 화학제품 - 20 °C에서 밀도 결정

4.2 고체물질

- (1) ISO 901 : 알루미늄 생산에 사용되는 산화알루미늄 - 절대 밀도 측정법

- 주2) Weissberger, R., ed. (1959). Technique of Organic Chemistry, Vol. I, Part 1, Chapter IV, Physical Methods of Organic Chemistry, 3rd ed., Interscience Publ., New York
- 주3) Wagenbreth, H. (1979). Die Tauchkugel zur Bestimmung der Dichte von Flüssigkeiten, Technisches Messen, 11, 427-430.
- 주4) Leopold, H. (1970). Die digitale Messung von Flüssigkeiten, Elektronik, 19, 297-302.
- 주5) Baumgarten, D. (1975). Die Pharmazeutische Industrie, 37, 717-726.
- 주6) Riemann, J. (1976). Brauwirtschaft, 9, 253-255.

제7항 입자 크기 분포/섬유길이 및 직경 분포시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 액상과 공기 중에서 분산된 분말이나 화학물질의 입자 크기 분포 또는 섬유 형태의 화학물질의 길이 및 직경 분포를 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 입자 크기 분포시험에서 주요 파라미터는 유효 유체역학 반경(Effective hydrodynamic diameter) 혹은 Stoke 유효 반경인 R_s 다. 점성을 지닌 유체에서 중력의 영향으로 낙하하는 작은 구의 최종 속도는 다음과 같다.

$$v = 2gR_s^2 \frac{(d_1 - d_2)}{9\eta}$$

여기에서, v = 속도(m/sec)

g = 중력 상수(m/sec²)

R_s = Stoke 반경(m)

d_1 = 구 밀도(kg/m³)

d_2 = 유체 밀도(kg/m³)

η = 유체의 역학 점도(Nsec/m² = Pa · s)

다른 상황에서 유사한 관계가 적용되기도 하며 입자 크기는 보통 μm 로 측정된다.

2.2 섬유 길이 및 직경 분포시험에서 섬유의 길이(l) 및 직경(d)의 분포를 히스토그램으로 나타낸다. 세로좌표는 l 또는 d 간격마다 나타나는 입자의 절대치를 의미한다. 대표적인 그래프의 예는 그림 1, 2와 같다.

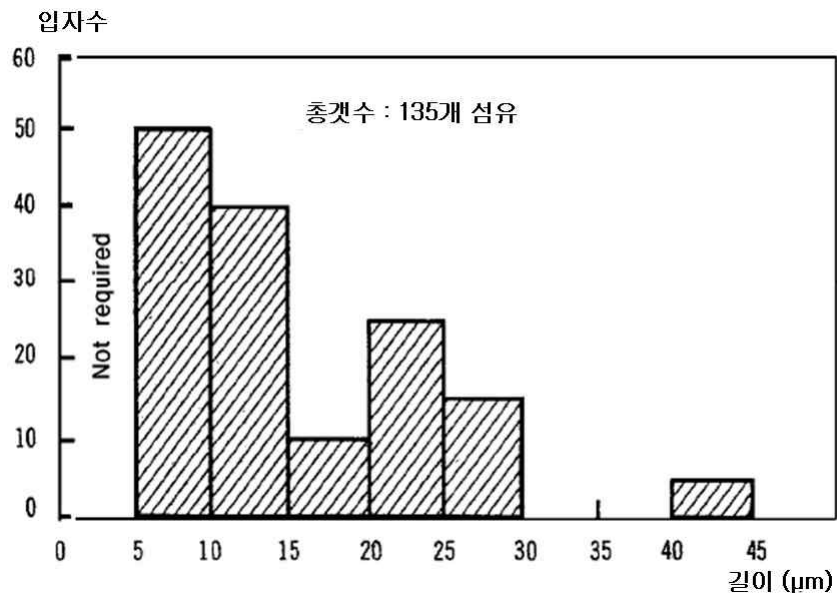


그림 1. 섬유 길이 분포예시

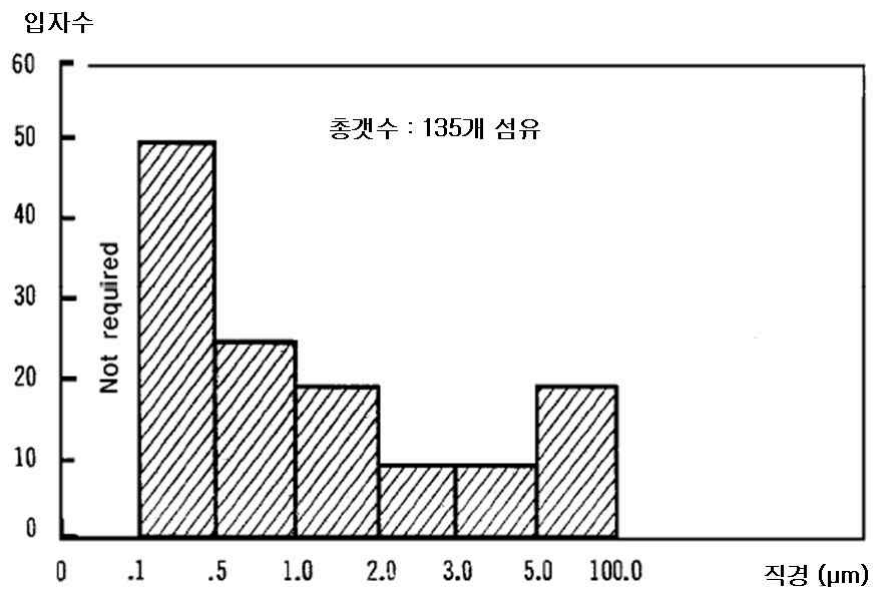


그림 2. 섬유 직경 분포 예시

2.3 표준물질

0.35 μm ~ 650 μm (50 μm ~ 200 μm 범위 제외) 범위의 입자 크기를 갖는 5종류 표준물질에 대해서 입자의 누적 질량 분포(Cumulative mass distribution)

vs 등가 침강 속도 직경(Equivalent settling rate diameter) 또는 입자의 누적 질량 분포 vs 등가 부피 직경(Equivalent volume diameter)가 입증되어 있다. 이들 표준물질의 종류 및 인증 보고서는 유럽 경제 공동체의 'Community bureau of reference'에서 찾아볼 수 있다(주 1).

2.3.1 보정 물질

2.3.1.1 입자 크기 분포시험

직경 2 ~ 100 μm 범위의 라텍스 구 2 종 혹은 3 종 혼합물

2.3.1.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

사용 가능한 표준물질 없음

2.3.2 평가 물질

2.3.2.1 입자 크기 분포시험

직경 2 μm , 50 μm , 100 μm 범위의 라텍스 구 혼합물(불연속 분포)에 분쇄된 석영 시료(연속 분포)를 더하여 평가물질로 사용한다.

2.3.2.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

섬유 모양의 온석면이 권장된다(링 테스트 결과 이상분포를 나타낼 정도로 충분히 혼합된 시료인 경우 특별한 사양은 없음).

2.4 정도보증 및 정도관리

2.4.1 재현성

2.4.1.1 입자 크기 분포시험

유효 유체역학 반경 분포를 3 회 측정하였을 때 두 값의 차이가 20 % 이내이어야 한다.

2.4.1.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

섬유의 길이 및 직경 분포는 독립적인 시료 채취 및 제조 과정을 거쳐 최소 2 회 측정하여야 한다. 이때 그래프 당 최소 70 개의 섬유를 사용하여 시험한다.

히스토그램 간격 내에서 두 값이 50 % 이상 차이가 나거나 섬유 개수 차이가 3 개 이상 차이가 나서는 안 된다. 가늘고 긴 섬유는 잠재적 건강 위해 물질이므로 이들에 대해서는 보다 정밀한 측정이 수행되어야 한다.

2.4.2 민감도

2.4.2.1 입자 크기 분포시험

2 μm 보다 작은 입자와 200 μm 보다 큰 입자를 측정할 수 있어야 한다. 또한 반경 분포 곡선을 분석하기 위해서 충분한 수의 반경 간격을 사용하여야 한다.

2.4.2.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

직경이 0.2 μm 보다 작은 입자와 100 μm 보다 큰 입자를 측정할 수 있고 길이가 5 μm 이하인 섬유와 300 μm 이상인 섬유를 측정할 수 있어야 한다.

2.4.3 표준화 가능성

본 시험법의 시험 절차의 표준화는 용이하지만 시료의 채취, 조제 및 전처리 과정이 균일하지 않으면 섬유 길이 및 직경 분포시험의 결과에 상당한 편차가 발생할 수 있다.

2.4.4 자동화 가능성

본 시험법은 자동화 및 반자동화가 가능하다. 섬유의 길이와 직경 측정 및 분석 과정도 자동화할 수 있다.

II. 시험

입자 크기를 측정하는 시험방법은 많지만 전체 크기 범위에 적용할 수 있는 시험법은 없다. 가장 흔히 사용되는 시험방법으로는 체 사용법(Sieving), 미세 침강법(Microscopic sedimentation), 세광법(Elutriation technique), 광산란법(Light scattering method) 등이 있다.

본 시험법에 수록된 두 가지 시험방법은 물에 대한 용해도가 10^6 g/L 미만인 시험물질에 대해서만 적용 가능하다. 입자 크기 분포시험은 유효 유체역학 반경

R_s 를 측정하는 방법으로 R_s 가 2 μm ~ 100 μm 범위인 섬유 및 비섬유 입자에 적용할 수 있다. 섬유 길이 및 직경 분포시험은 자주 사용되는 방법은 아니나 비교적 전문적인 시험방법으로 현미경 검사가 포함되어 있다. 이 방법은 섬유를 형성하는 물질인 경우에 적용하는데 이때 섬유란 길이와 직경의 비가 3 이상이고 직경이 100 μm 이하인 불용성 미립자를 의미한다.

1. 시험방법

1.1 입자 크기 분포시험

1.1.1 원리

입자 크기 분포 측정 시 민감도 기준을 만족시키는 몇 가지 표준 시험법 목록이 표 1에 수록되어 있다. 시험물질의 대략적인 성질(예 : 판상, 침상 등)을 알아보기 위해서 간단한 현미경 검사를 수행한다.

1.1.2 장치 및 기구

시험은 일반적인 환경에서 수행하며 모든 시험방법들에 사용되는 측정 기구들은 사용이 용이하다. 침강법의 경우 피펫과 침강저울을 사용한다.

표 1. 입자 크기 분포 측정 시험법

측정 원리	시험법
침강법	ASTM-D 3360, D 422
	NF-T 30044
	DIN - 66-115
원심분리법	ASTM - C 678
	Chem. Ing. Tech. 46, 729 (1974)
코울터 카운터법	ANSI-C 690-75

1.1.3 시험물질의 조제

시험에 사용되는 소량의 시료로 킬로그램 단위의 제품군을 대표할 수 있어야 하므로 시료 채취 및 제조 과정에 주의를 기울여야 한다. 예를 들어, 시험물질이

작은 입자인 경우 응집되기 쉬우므로 입자 크기를 측정하기 전에 분산제 첨가, 교반, 초음파 처리 등과 같은 전처리 과정을 거쳐야 한다. 이 과정에서 입자 크기 분포가 변화하지 않도록 주의한다. 매우 안정된 응집제의 경우 본래의 입자와 응집된 입자 사이에 엄격한 구분이 필요치는 않다. 대표적인 시료 전처리 방법은 표 1에 수록된 표준 시험법을 참조한다.

1.1.4 시험절차

표 1에 제시한 표준 시험법의 시험절차에 따라 시험을 수행한다.

1.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

1.2.1 원리

직경이 작은 섬유($0.1\ \mu\text{m}$ 이상)를 대상으로 하므로 주사형 전자현미경(SEM : Scanning electron microscopy) 또는 투과형 전자현미경(TEM : Transmission electron microscopy)이 필요하다. 아직까지 표준화된 시험법은 확립되지 않았으며 현재 석면(섬유성 물질임이 확인되었으며 고농도로 존재함) 오염을 측정하는 목적으로 개발 중인 시험방법은 필요 이상으로 복잡하며 비용이 많이 소요된다. 시험물질을 조제하는 동안 섬유가 파괴되거나 덩어리지거나 오염되지 않도록 주의해야 한다. 섬유의 길이와 직경은 수동, 반자동 및 자동으로 측정할 수 있고 시험결과는 히스토그램으로 나타낸다(그림 1, 그림 2 참조).

1.2.2 장치 및 기구

공기 중에 존재하는 섬유로 인한 오염이 발생하지 않도록 주의한다. 가능하면 후드나 무균실에서 시험을 수행한다. 소형 전자현미경 및 부대장비들이 필요하다.

1.2.3 시험물질의 조제

본 시험법에서는 주사형 전자현미경을 사용하여 측정할 때 이용되는 간단한 시험물질 조제 방법을 수록하고 있다.

(1) 방법 1

여과한 증류수나 탈이온수(10 mL ~ 100 mL)에 일정량의 시험물질을 넣고 현탁시킨다. 무수 에탄올이나 비이온성 세제와 같은 계면활성제를 소량(0.01 %) 첨가하면 현탁액 내의 입자를 고르게 분포시킬 수 있다. 손으로 부드럽게 휘저어주거나 Vortex 또는 자석 교반기로 교반하면 가루 현탁액을 만들 수 있다. 직경 47 mm의 Millipore 필터 홀더(히드로졸, 스테인레스)에 직경 47 mm Millipore 멤브레인 필터를 장착하고 약한 진공을 걸어 현탁액을 여과한다. 이 때, 가루가 현탁액으로부터 침전되지 않는지 확인한다. 측정하고자 하는 입자의 크기에 따라 적절한 직경의 필터를 선택한다. 부유 입자 농도에 따라 여과량이 결정된다. 현탁액의 농도가 낮을수록 필터 표면에 입자가 고르게 분포한다(주 2). 필터 홀더에서 필터를 제거할 때 필터 표면의 입자가 흐트러지지 않도록 조심해야 한다. 제거한 필터를 Whatmann No. 1 필터종이를 얹은 페트리접시(유리 혹은 플라스틱 재질)에 위에 놓고 페트리 접시 뚜껑을 덮어 건조 상자나 진공 상태에 둔다. 완전히 건조되면 필터를 적당한 크기로 자른 후 필터 면이 위로 향하게 하여 현미경 표본 홀더의 구리 테이프(양면테이프 사용) 위에 놓는다. 테이프의 점성을 유지하기 위해 적외선 또는 유사한 열원으로 5 분 ~ 15 분 동안 예열한다. 현미경 표본 홀더에 맞도록 모서리를 다듬는다.

(2) 방법 2

현미경 표본 홀더에 표본 홀더에 장착해 놓은 구리 테이프(접착용 전기테이프) 위에 건조된 가루를 직접 옮기거나 큰 고무벨브가 장착된 분무기 또는 피펫을 사용하여 구리 테이프 표면에 가루를 뿌린다.

1.2.4 시험절차

1.2.3에서 언급한 방식으로 조제한 시료를 주사형 전자현미경 표본 홀더 위에 놓고 현미경으로 측정한다. 또는 스퍼터 장치(Sputtering device)나 진공 증발기를 이용하여 금속 필름으로 코팅한 후 측정한다. 시험물질을 대표할 수 있는 시료를 얻기 위해서 시료 표면 중 대표 영역을 다양한 배율로 확대하여 촬영한다. 필

요한 경우, 시료의 오염여부를 확인하기 위해 에너지 분산 엑스레이 분석(EDXA, Energy dispersive x-ray analysis)을 실시할 수도 있다.

입자 크기 분포는 현미경 화면상에서 직접 측정하거나 사진을 찍어서 측정할 수 있다. 현미경에 영상 분석 장치가 장착되어 있다면 직접 개체 통계를 낼 수도 있다. 이러한 측정 절차는 자동화 또는 반자동화할 수 있다(주 3). 영상에 시료의 농도가 너무 높게 나타나면 희석한 용액으로 반복 실험을 수행한다.

1.3 분석

대표적인 분석 방법은 주 1 ~ 주 8을 참조한다. 측정 방법에 따라 입자 크기 분포가 달라질 수 있으므로 측정 방법을 반드시 기록하여야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 입자 크기 분포시험

시험 결과는 세 가지 입자 크기 범위($200\ \mu\text{m}$ 초과, $2\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m}$ 미만)에서 얻어야 하며 $2\ \mu\text{m} \sim 200\ \mu\text{m}$ 범위에서 얻어진 결과값은 분포 곡선이 나타나야 한다. 부분 모집단 분석을 수행하기 위해 충분한 범위에서 입자 크기를 측정하여야 한다. 히스토그램을 설명할 때 $200\ \mu\text{m}$ 이상인 물질 및 $2\ \mu\text{m}$ 이하인 물질의 중량 백분율을 언급하여야 한다.

1.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

직경이 $0.1\ \mu\text{m}$ 이상이고 길이가 $5\ \mu\text{m}$ 이상인 섬유의 경우 길이(l)와 직경(d)을 측정한다. 최소 50 개의 섬유를 대상으로 각각 시험을 수행하여 2 개의 히스토그램 분포도를 만든다. 직경의 범위는 $0.1\ \mu\text{m} \sim 0.5\ \mu\text{m}$, $0.5\ \mu\text{m} \sim 1.0\ \mu\text{m}$, $1\ \mu\text{m} \sim 2\ \mu\text{m}$, $2\ \mu\text{m} \sim 3\ \mu\text{m}$, $3\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$ 및 $5\ \mu\text{m}$ 이상, 길이의 범위는 $0\ \mu\text{m} \sim 5\ \mu\text{m}$, $5\ \mu\text{m} \sim 10\ \mu\text{m}$, $10\ \mu\text{m} \sim 15\ \mu\text{m}$, $15\ \mu\text{m} \sim 20\ \mu\text{m}$ (등)이어야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 :

2.5.1 입자 크기 분포시험

(1) 보고된 수치의 예상 백분율 변화값(예 : 제품군간 편차)

(2) 시료 제조방법

(3) 분석방법

(4) 입자형태에 대한 대략적 정보(예 : 구형, 판형, 침상형 등)

(5) 제품 번호, 시료 번호

(6) 현탁 매질, 온도, pH

(7) 농도

(8) $2\ \mu\text{m} \leq R_s \leq 200\ \mu\text{m}$ 범위에서 Stoke's 반경 R_s 분포

(9) R_s 분포에서 분석 가능한 모든 피크의 평균값 및 대략적인 면적

(10) $R_s \leq 2\ \mu\text{m}$ 입자 %

(11) $R_s \leq 200\ \mu\text{m}$ 입자 %

2.5.2 섬유 길이 및 직경 분포시험

(1) 시료 및 시험방법에 대한 설명

(2) 범위(Field) 당 입자 수

(3) 측정된 섬유의 총 수

(4) 길이(l)와 직경(d) 분포(히스토그램)

(5) R_s 분포에서 분석 가능한 모든 피크의 평균값 및 대략적인 면적

- 주1) Certification Report on Particles of Defined Particle Size, Community Bureau of Reference, Brussels (1979).
- 주2) R.R. Irani and C.F. Callis, *Particle Size Measurement*, Interpretation and Application.
- 주3) S. Orr and J.M. Dallavalle, Fine Particle Measurement.
- 주4) T. Allen, *Particle Size Measurement*, Chapman and Hall, London (1975).
- 주5) P.P. McGrath and J. B. Ewell, Application of Electron Microscopy to Problem of Particulate Contaminants in Food, Drugs and Biologicals, *Scanning Electron Microscopy*, Part III, 1976.
- 주6) *Symposium on Electron Microscopy of Microfibers*, edited by I.M. Asher and P.P. McGrath, Proceedings of the First FDA Office of Science Summer Symposium, (August 23-25, 1976).

제8항 pH에 따른 가수분해시험

I. 개요

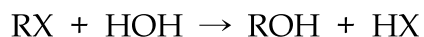
1. 목적

본 시험법은 일반적 환경의 pH 범위(pH 4 ~ pH 9)에서 수중에 존재하는 화학물질의 비생물적 가수분해 속도 및 가수분해 산물의 종류, 특성, 생성 속도 및 감소 속도를 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 가수분해

시험물질(RX)이 물과 반응하여 OH기와 X기가 서로 치환되는 반응



위 식에서 시험물질의 농도가 감소하는 속도는 속도결정 단계에 따라 달라진다.

$$\text{rate} = k[H_2O][RX] \quad 2 \text{ 차 반응식}$$

혹은

$$\text{rate} = k[RX] \quad 1 \text{ 차 반응식}$$

가수분해의 경우 시험물질의 양에 비해 물이 과량으로 존재하기 때문에 다음과 같은 유사 1차 반응식을 따르게 된다.

$$k_{obs} = k[H_2O]$$

다음 식으로 결정할 수 있다.

$$k_{obs} = \frac{1}{t} \ln \frac{C_0}{C_t}$$

여기에서, t = 시간,

C_0 = 시간 0에서 RX의 농도

C_t = 시간 t 에서 RX의 농도

단, \log 변형값 vs 시간 그래프가 1 차 함수가 아닌 경우에는 적합하지 않다. 이 상수의 단위는 t^{-1} 이고, 반감기(RX의 50 %가 반응)는 다음과 같다.

$$t_{0.5} = \frac{\ln 2}{k_{obs}}$$

2.2 반감기($t_{0.5}$)란 반응식이 1 차 반응 속도식을 따를 경우 시험물질의 50 %가 가수분해 되는데 소요되는 시간을 의미한다. 반감기는 농도와 무관하다.

2.3 50 % 소멸시간(DT_{50} : Disappearance time 50)은 시험물질의 50 %가 감소하는데 걸리는 시간을 의미한다. 반응식이 1 차 반응 속도식을 따르지 않을 경우 $t_{0.5}$ 와 DT_{50} 은 다르다.

2.4 두 온도에서의 속도 상수를 알고 있을 경우 Arrhenius 방정식을 사용하여 다른 온도에서의 속도 상수를 구할 수 있다.

$$k = A \times e^{-\frac{E}{R \times T}} \quad \text{또는} \quad \ln k = \frac{-E}{R \times T} + \ln A$$

여기에서, k = 다른 온도에서 측정된 속도 상수

E = 활성화 에너지(kJ/mol)

T = 절대온도(K)

R = 기체상수(8.314 J/mol · K)

활성화 에너지는 회귀분석 또는 다음의 식으로부터 구한다.

$$E = R \times \frac{\ln k_2 - \ln k_1}{\left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)}$$

여기에서, $T_2 > T_1$

2.5 정도보증 및 정도관리

2.5.1 회수율

완충용액 또는 시험물질을 첨가한 직후 생성되는 추출물을 최소 2 회 반복 분석하여 분석방법의 재현성 및 시험절차의 일관성을 확인한다. 표지 물질을 사용할 경우 시험 후반부의 회수율은 각각의 질량 균형 값으로 나타낸다. 표지 및 비표지 물질에 대한 회수율은 90 % ~ 110 % 범위이어야 한다(주 1). 기술적인 문제로 이 범위에 도달하기 어려운 경우, 타당한 근거를 제시하면 비표지 물질에 대한 회수율이 70 %인 것까지는 수용 가능하다.

2.5.2 재현성 및 민감도

정량분석을 수행하기에 충분한 정도로 가수분해 산물이 생성되면 완충용액 또는 그 추출물에 대해 2 회 반복 분석을 수행하여 시험물질 및 그 가수분해 산물의 분석에 사용되는 분석법의 재현성을 확인한다.

분석방법은 초기 농도의 10 % 이하 농도까지 시험물질을 정량할 수 있어야 한다. 각 가수분해산물은 검출농도의 10 % ~ 25 % 농도까지 정량할 수 있어야 한다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장비 및 장치

1.1.1 시험 용기 : 유리에 흡착되지 않는 시험물질의 경우 멸균한 유리용기(시험관, 작은 플라스크 등)를 사용하여 암조건에서 시험을 수행한다. 유리에 흡착되는 시

시험물질의 경우 테플론과 같은 재질의 용기를 사용할 수 있으며 다음의 방법들을 통하여 문제를 해결할 수도 있다.

- (1) 시험 용기에 흡착되는 시험물질 및 가수분해 산물의 양을 측정
- (2) 초음파 중탕기 사용
- (3) 시료 채취 동안 모든 유리 제품을 용매로 세척
- (4) 제품(Formulated products)을 사용
- (5) 시험물질 첨가를 위해 보조 용제(Co-solvent) 사용(단, 보조 용제로 인해 시험 물질이 가수분해되지 않아야 함)

1.1.2 온도 조절이 가능한 항온 진탕기(Water bath shaker) 또는 자동 온도 조절이 가능한 배양기

1.1.3 pH 측정기

1.1.4 역 동위원소 희석법(Inverse isotopes dilution method) 또는 방사성 동위 원소 표지/비표지 물질 분석이 가능한 분석 장치(GC, HPLC, TLC 등)

1.1.5 분석물질 확인을 위한 장치(MS, GC-MS, HPLC-MS, NMR 등)

1.1.6 액체섬광 계수기(Liquid scintillation counter)

1.1.7 액-액 추출용 분액깔때기

1.1.8 용액 및 추출물 농축용 장치(회전 증발기)

1.1.9 온도 조절 장치(물중탕 장치)

1.1.10 다음과 같은 화학시약

- (1) 핵산, 디클로로메탄 등과 같은 분석용 등급의 유기 용매
- (2) 액체 섬광제
- (3) 완충용액

1.1.11 가수분해 시험에 사용되는 모든 유리 기구, 시약용 물, 완충용액은 멸균 처리를 해야 한다.

1.2. 시험물질

시험물질은 완충용액에 녹여 수용액으로 제조한다(부록 1). 필요한 경우 시험물

질을 용해시키기 위해 물과 섞이는 소량의 용매(아세토니트릴, 아세톤, 에탄올 등)를 사용할 수 있으나 일반적으로 그 양은 1 % (v/v)를 넘지 않아야 한다. 시험물질의 물용해도가 매우 낮아서 고농도의 용매를 사용하여야 하는 경우 용매가 시험물질의 가수분해에 영향을 주지 않는다는 것을 입증하여야 한다.

제형 성분(Formulation ingredients)이 가수분해에 영향을 줄 가능성이 있으므로 제품의 사용은 권장되지 않는다. 그러나 시험물질이 물에 난용성이거나 유리용기에 흡착되는 경우 제조 물질(Formulated material)을 사용할 수 있다.

단일 농도에서 시험을 수행하며 그 농도는 0.01 M 또는 포화 농도의 50 %를 초과해서는 안 된다.

1.3. 완충용액

pH 4, pH 7, pH 9에서 가수분해 시험을 수행한다. 가수분해 시험을 위한 완충용액을 준비한다. 주로 사용되는 완충용액의 예가 부록 1에 제시되어 있다. 완충용액이 시험물질의 가수분해 속도에 영향을 미칠 경우 대체 완충용액을 사용할 수 있다(주 2).

해당 온도에서 최소 0.1의 정밀도를 가진 pH 측정기로 완충용액의 pH를 측정하여야 하며 측정 전에 보정을 한다.

1.4 시험조건

1.4.1 시험온도

가수분해 시험은 일정한 온도에서 수행되어야 한다. 외삽법으로 추정하기 위해서는 온도 편차를 ± 0.5 °C로 유지해야 한다.

시험물질의 가수분해 성질에 대한 정보가 없을 경우 50 °C에서 예비 시험을 수행한다. 예비시험 결과 시험물질이 안정적으로 가수분해하지 않는 경우 50 °C를 포함하여 최소한 3 개의 온도에서 시험을 수행한다. 권장되는 온도 범위는 10 °C ~ 70 °C이며 25 °C 이하 온도가 최소한 한 개 포함되도록 한다.

1.4.2 빛과 산소

광분해 효과를 차단할 수 있는 적당한 방법을 사용하여 가수분해 시험을 수행하여야 한다. 시험용액을 준비하기 전 5 분 동안 헬륨, 질소, 아르곤 등 가스를 불어넣어주는 방법으로 산소 발생을 억제 시킨다.

1.4.3 시험기간

예비시험은 5 일간 수행하며 더 높은 단계의 시험은 시험물질의 90 %가 가수분해 될 때까지 또는 30 일간(양자 중 더 짧은 시간 선택) 시험을 수행한다.

2. 시험방법

2.1 원리

각기 다른 종류의 pH값을 갖는 멸균 완충용액(pH 4, pH 7, pH 9)에 시험물질을 가하고 압조건에서 적당한 시간 간격을 두고 완충용액 중 시험물질 및 그 가수분해 산물을 분석한다. 시험물질을 ^{14}C 과 같은 동위원소로 표지한 경우 질량 분석법으로 분석할 수 있다. 본 시험법의 개략적인 시험절차 흐름도는 부록 2에 수록되어 있다.

2.2 시험절차

2.2.1 예비시험(Tier I)

예비시험은 $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 4, pH 7, pH 9에서 수행한다. 5 일 후 관찰하였을 때 시험물질의 10 % 미만이 가수분해 된 경우($t_{0.5(25^{\circ}\text{C})} > 1\text{ 년}$) 시험물질은 가수분해를 받지 않는 안정한 물질로 간주하며 더 이상의 시험을 진행하지 않아도 된다. 시험물질이 환경 중 온도에서 불안정한 것으로 알려져 있는 경우 예비시험을 수행할 필요가 없다(주 3).

2.2.3 불안정한 물질의 가수분해(Tier II)

예비시험 결과 시험물질이 불안정하다고 판단될 경우 다음 단계의 시험을 수행하여야 한다. 시험물질의 완충용액은 시험 온도로 항온이 유지되어야 한다. 시험물질의 10 % ~ 90 %가 가수분해 되는 구간에서 적어도 6 개 지점을 선택

하여 시간 간격을 두고 분석한다. 각각 2 개의 독립된 시험용기에서 가수분해 시험을 수행한다. 한 용기 당 최소 2 개의 시료를 채취하여 분석한다. 자료의 변화에 대한 분석이 불가능하며 오염의 위험이 있으므로 단일 시험용기에서 시료를 채취하는 것은 적절치 않다. 최종 단계에서 무균 상태임을 확인하는 시험을 수행하여야 한다. 단, 시험물질이 변형되지 않으면 무균 확인 시험을 수행하지 않아도 된다.

2.2.4 가수분해 생성물의 확인(Tier III)

적당한 분석 방법을 이용하여 초기 용량의 10 % 이상인 모든 주요 가수분해 산물을 확인한다.

2.2.5 선택 시험

가수분해에 불안정한 시험물질의 경우 pH 4, pH 7, pH 9 이외의 pH 범위에서 추가 시험을 수행할 수 있다. 예를 들어 생리화학적 목적의 시험인 경우, 보다 산성인 조건(pH 1.2)에서 생리학적 온도인 37 °C에서 시험을 수행할 수 있다.

2.3 시험상의 유의사항

본 시험법은 물에 충분히 용해되는 약취발성 또는 비취발성 물질을 대상으로 하며 충분한 정확도와 민도를 갖는 분석법이 확립되어 있어야 한다. 물에서 휘발성이 높은 화학물질(훈증제, 유기 용매 등)이나 최소한의 수용해도를 갖는 물질에 대해서는 적용하기 어렵다(주 4).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험물질 및 가수분해 산물의 양은 초기 용량에 대한 % 값으로 표기하며 가능하면 각각의 시료 채취 시간, pH, 시험 온도에서 mg/L로 기록한다. 표지 물질을 사용할 경우 질량 균형값을 초기 용량에 대한 % 값으로 표기한다.

- 1.2 시험물질 농도 vs 시간 관계를 log 환산 그래프로 제시하여야 한다. 초기 용량의 10 %를 넘는 모든 주요 가수분해 산물에 대해서는 가수분해 산물을 확인하고 가수분해 산물의 생성 및 감소 속도를 보여주는 가수분해 산물 농도 vs 시간의 log 환산 그래프를 제시하여야 한다.
- 1.3 적절한 역학 모델 계산법을 사용하여 반감기 또는 DT_{50} 값을 계산한다. 역학 모델 및 결정계수(r^2)에 대한 설명과 함께 각각의 pH 및 온도에서 반감기 또는 DT_{50} 값을 신뢰 한계와 함께 보고해야 한다. 가능하면 가수분해 산물에 대한 반감기 또는 DT_{50} 값을 구한다.
- 1.4 다른 온도에서 시험을 수행한 경우, 유사 1 차 가수분해 속도 상수(k_{obs})(Pseudo first-order hydrolysis rate constant)는 온도의 함수로 표시하여야 한다. k_{obs} 를 산 촉매, 중성 촉매, 염기 촉매 가수분해 속도 상수(k_H , $k_{neutral}$, k_{OH})로 구분하여 계산하는데, Arrhenius 방정식은 다음과 같다.

$$k_{obs} = k_H [H^+] + k_{neutral} + k_{OH} [OH^-] = \sum_{i=H, neutral, OH} A_i e^{-B_i/T}$$

여기서, A_i 및 B_i 는 $\ln k_i$ vs $1/T(K)$ 선형 회귀직선의 절편 및 기울기값이다. 산 촉매, 중성 촉매, 염기 촉매 가수분해의 경우 Arrhenius 방정식을 사용하여 유사 1 차 가수분해 속도 상수를 계산할 수 있고, 속도 상수를 실험으로 구할 수 없는 온도에서의 반감기도 계산할 수 있다(주 5).

- 1.5 가수분해속도, 모든 회귀계수, 반응속도 상수, 반감기 및 다른 모든 속도 매개 변수(즉, DT_{50})에 대한 신뢰 구간을 계산하여 제시해야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등)

(2) CAS 번호

(3) 구조식(표지물질을 이용하는 경우 표지 위치를 표시)

(4) 입수처, 입수일

(5) 순도 또는 불순물

(6) 표지 물질의 순도 및 물 활성도

2.5 완충용액 : (1) 제조 날짜 및 상세설명

(2) 사용된 완충용액 및 물

(3) 완충용액의 물 농도 및 pH

2.6 시험조건 : (1) 시험 날짜

(2) 사용한 시험물질의 양

(3) 시험물질을 용해시키는데 사용한 방법 및 용매의 종류와 양

(4) 배양한 시험물질 완충 용액의 양

(5) 사용한 배양 시스템에 대한 설명

(6) 시험을 수행하는 동안의 pH 및 온도

(7) 시료 채취 시간

(8) 추출 방법

(9) 완충 용액 중 시험물질 및 그 가수분해 산물의 정량 및 확인 방법

(10) 반복 횟수

2.7 시험결과 : (1) 사용한 분석방법의 재현성 및 감도

(2) 회수율

(3) 반복 실험 결과값 및 평균값을 테이블 형식으로 정리

- (4) 표지 물질을 사용하는 경우 시험 중간 및 최종 단계에서 질량 균형값
- (5) 예비시험 결과
- (6) 시험결과에 대한 토론 및 분석
- (7) 모든 초기 결과 자료 및 그림
- (8) 시험 온도 및 pH별 시험물질 농도 vs 시간의 그래프
- (9) 시험 온도 및 pH별 가수분해 산물의 농도 vs 시간의 그래프
- (10) 20 °C/25 °C에서 pH, 속도 상수(1/h 혹은 1/day), 반감기 또는 DT_{50} , 온도(°C), 신뢰 한계 및 상관계수(r^2)에 대한 Arrhenius식 결과표 혹은 이에 상응하는 결과
- (11) 예상 가수분해 경로

- 주1) SETAC (1995). Procedures for Assessing the Environmental Fate and Ecotoxicity of Pesticides. Mark R. Lynch, Ed.
- 주2) Mabey와 Mill은 인산염 대신 붕산염 혹은 초산염 완충용액의 사용을 추천함
- 주3) 이러한 정보는 구조적으로 유사한 화학물질의 가수분해 자료나 문헌 자료, 또는 시험물질을 이용한 다른 예비시험 혹은 준정량 가수분해 시험 결과로부터 얻을 수 있다.
- 주4) OECD (2000). Guidance document on aquatic toxicity testing of difficult substances and mixtures, OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment Nr.23.
- 주5) Nelson, H, Laskowski D, Thermes S, and Hendley P. (1997) Recommended changes in pesticide fate study guidelines for improving input to computer models. (Text version of oral presentation at the 14th Annual Meeting of the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Dallas TX, November 1993).

부록 1. 완충용액 조성

1. Clark-Lubs : Clark-Lubs 혼합 완충 용액^{a)}

(1) 0.2 N HCl + 0.2 N KCl (20 °C)

조성	pH
47.5 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	1.0
32.25 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	1.2
20.75 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	1.4
13.15 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	1.6
8.3 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	1.8
5.3 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	2.0
3.35 mL HCl + 25 mL KCl dil. to 100 mL	2.2

(2) 0.1 M Potassium biphthalate + 0.1 N HCl (20 °C)

조성	pH
46.70 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	2.2
39.60 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	2.4
32.95 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	2.6
26.42 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	2.8
20.32 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	3.0
14.70 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	3.2
9.90 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	3.4
5.97 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	3.6
2.63 mL 0.1 N HCl + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	3.8

(3) 0.1 M Potassium biphthalate + 0.1 N NaOH (20 °C)

조성	pH
0.40 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	4.0
3.70 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	4.2
7.50 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	4.4
12.15 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	4.6
17.70 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	4.8
23.85 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	5.0
29.95 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	5.2
35.45 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	5.4
39.85 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	5.6
43.00 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	5.8
45.45 mL 0.1 N NaOH + 50 mL biphthalate dil. to 100 mL	6.0

(4) 0.1M Monopotassium phosphate + 0.1 N NaOH NaOH (20 °C)

조성	pH
5.70 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	6.0
8.60 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	6.2
12.60 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	6.4
17.80 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	6.6
23.45 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	6.8
29.63 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	7.0
35.00 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	7.2
39.50 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	7.4
42.80 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	7.6
45.20 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	7.8
46.80 mL 0.1 N NaOH + 50 mL KH_2PO_4 dil. to 100 mL	8.0

(5) 0.1 M H_3BO_3 in 0.1 M KCl 속의 + 0.1 N NaOH (20 °C)

조성	pH
2.61 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	7.8
3.97 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	8.0
5.90 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	8.2
8.50 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	8.4
12.00 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	8.6
16.30 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	8.8
21.30 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	9.0
26.70 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	9.2
32.00 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	9.4
36.85 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	9.6
40.80 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	9.8
43.90 mL 0.1 N NaOH + 50 mL H_3BO_3 dil. to 100 mL	10.00

2. Kolthoff-Vleeschhouwer : Kolthoff-vleeschhouwer의 구연산염 완충액

(1) Monopotassium citrate + 0.1 N HCl^{b)}(18 °C)

조성	pH
49.7 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	2.2
43.4 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	2.4
36.8 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	2.6
30.2 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	2.8
23.6 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	3.0
17.2 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	3.2
10.7 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	3.4
4.2 mL 0.1 N HCl + 50 mL $\text{C}_6\text{H}_7\text{KO}_7$ dil. to 100 mL	3.6

(2) Monopotassium citrate + 0.1 N NaOH^b(18 °C)

조성	pH
2.0 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	3.8
9.0 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	4.0
16.3 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	4.2
23.7 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	4.4
31.5 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	4.6
39.2 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	4.8
46.7 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	5.0
54.2 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	5.2
61.0 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	5.4
68.0 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	5.6
74.4 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	5.8
81.2 mL 0.1 N NaOH + 50 mL C ₆ H ₇ KO ₇ dil. to 100 mL	6.0

3. SÖRENSEN: Sorensen의 Borate 혼합물

(1) 0.05 M Borax + 0.1 N HCl

성분		Sörensen 18 °C	Walbum, pH at		
Borax (mL)	HCl (mL)		10 °C	40 °C	70 °C
5.25	4.75	7.62	7.64	7.55	7.47
5.50	4.50	7.94	7.98	7.86	7.76
5.75	4.25	8.14	8.17	8.06	7.95
6.00	4.00	8.29	8.32	8.19	8.08
6.50	3.50	8.51	8.54	8.40	8.28
7.00	3.00	8.08	8.72	8.56	8.40
7.50	2.50	8.80	8.84	8.67	8.50
8.00	2.00	8.91	8.96	8.77	8.59
8.50	1.50	9.01	9.06	8.86	8.67
9.00	1.00	9.09	9.14	8.94	8.74
9.50	0.50	9.17	9.22	9.01	8.80
10.00	0.00	9.24	9.30	9.08	8.86

(2) 0.05 M Borax + 0.1 N NaOH

성분		Sörensen 18 °C	Walbum, pH at		
Borax (mL)	HCl (mL)		10 °C	40 °C	70 °C
10.0	0.0	9.24	9.30	9.08	8.86
9.0	1.0	9.36	9.42	9.18	8.94
8.0	2.0	9.50	9.57	9.30	9.02
7.0	3.0	9.68	9.76	9.44	9.12
6.0	4.0	9.97	10.06	9.67	9.28

(3) Sörensen의 phosphate 혼합물

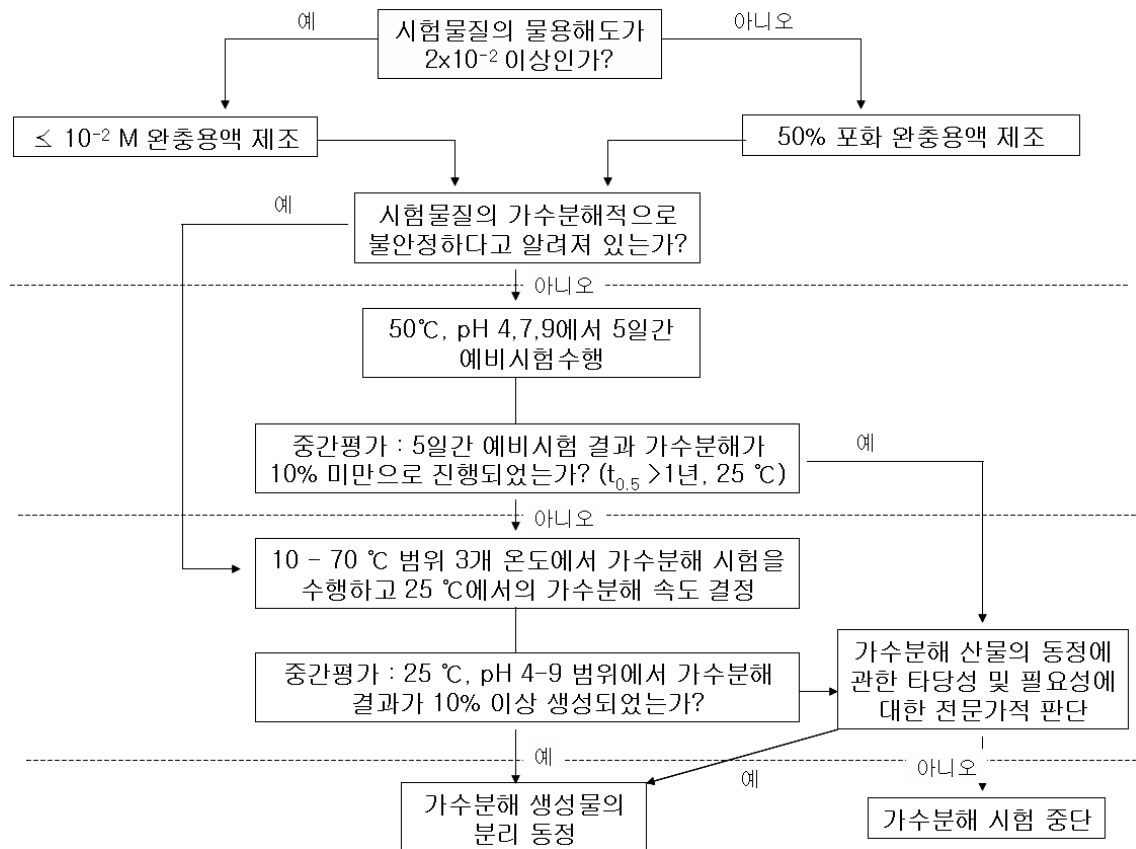
: 0.0667 M Monopotassium phosphate + 0.067 M Disodium phosphate (20 °C)

조성	pH
99.2 mL KH_2PO_4 + 0.8 mL Na_2HPO_4	5.0
98.4 mL KH_2PO_4 + 1.6 mL Na_2HPO_4	5.2
97.3 mL KH_2PO_4 + 2.7 mL Na_2HPO_4	5.4
95.5 mL KH_2PO_4 + 4.5 mL Na_2HPO_4	5.6
92.8 mL KH_2PO_4 + 7.2 mL Na_2HPO_4	5.8
88.9 mL KH_2PO_4 + 11.1 mL Na_2HPO_4	6.0
83.0 mL KH_2PO_4 + 17.0 mL Na_2HPO_4	6.2
75.4 mL KH_2PO_4 + 24.6 mL Na_2HPO_4	6.4
65.3 mL KH_2PO_4 + 34.7 mL Na_2HPO_4	6.6
53.4 mL KH_2PO_4 + 46.6 mL Na_2HPO_4	6.8
41.3 mL KH_2PO_4 + 58.7 mL Na_2HPO_4	7.0
29.6 mL KH_2PO_4 + 70.4 mL Na_2HPO_4	7.2
19.7 mL KH_2PO_4 + 80.3 mL Na_2HPO_4	7.4
12.8 mL KH_2PO_4 + 87.2 mL Na_2HPO_4	7.6
7.4 mL KH_2PO_4 + 92.6 mL Na_2HPO_4	7.8
3.7 mL KH_2PO_4 + 96.3 mL Na_2HPO_4	8.0

a) 제시된 pH 값은 Sorensen 표준 방정식을 사용해, 추정된 측정값으로 계산한 값이다. 해당 pH 값은 표에 제시된 값보다 0.04 더 높다.

b) 곰팡이 성장을 막기 위해, 작은 티몰(Thymol) 결정 혹은 이와 유사한 물질을 첨가한다.

부록 2. 단계별 가수분해 시험 흐름도



제9항 물 해리상수시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 다양한 방법을 통해 화학물질에 대한 물에서의 해리상수를 결정하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 해리(dissociation)

두 개 이상의 화학종(chemical species)으로 이온화되는 가역반응



이때 반응에 관여하는 농도평형상수는 다음과 같다.

$$K = \frac{[R^+][X^-]}{[RX]}$$

예를 들어 R이 수소인 경우 농도평형상수는 다음과 같다.

$$K_a = [H^+] \cdot \frac{[X^-]}{[HX]} \quad \text{또는} \quad pK_a = pH - \log \frac{[X^-]}{[HX]}$$

2.2 표준물질

시험을 수행할 때마다 표준물질이 필요한 것은 아니다. 표준물질은 시험방법을 보정하는 목적이나 다른 시험방법을 적용하였을 때 그 결과를 비교할 목적으로 이용된다. 대표적인 표준물질 목록은 <표>과 같다.

<표> 표준물질의 종류 및 pK_a

표준물질	pK_a (주 1)	온도(℃)
p-Nitrophenol	7.15	25
Benzoic acid	4.12	20
p-Chloroaniline	3.93	20
Citric acid	3.14	20
	4.77	20
	6.39	20

2.3. 정도보증 및 정도관리

2.3.1 재현성

최소한 3 회 반복 측정하였을 때 오차 범위는 $\pm 0.1 \log$ 단위 이내이어야 한다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험물질의 조제

적정법 및 전도도법으로 시험할 경우 시험물질은 증류수에 용해시킨다. 분광광도법이나 그밖에 다른 시험법으로 시험할 경우 시험물질은 완충용액에 녹인다. 가능한 높은 순도의 시험물질을 사용하며 그 농도는 0.01 M 또는 포화농도의 50 %를 넘지 않도록 한다. 시험물질을 완충용액에 녹이는 경우 완충용액의 농도는 0.05 M을 초과해서는 안 된다.

시험물질이 잘 녹지 않는 경우 물과 섞이는 용매를 소량 사용하여 시험물질의 용해도를 증가시킬 수 있다. 시험물질의 용해도를 높이기 위해 보조 용매를 사용한 경우 틴들 빔(Tyndall beam)을 사용하여 용액 중에 에멀전이 존재하는지 여부를 확인하여야 한다.

1.2 시험조건

본 시험은 $20 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 범위에서 수행한다. 단, 온도에 의한 영향이 크다고

판단되는 경우에는 최소 2 가지 온도에서 시험을 수행하며 두 온도 차이는 10 °C 이어야 하며 오차 범위는 ± 0.1 °C 이내이어야 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

화학물질이 환경에 미치는 영향을 평가할 때 그 물질이 물에서 해리되는 정도는 중요한 요소이다. 물에서의 해리 정도에 따라 화학물질의 거동 및 이동을 좌우하는 물질의 형태가 결정된다. 물에서의 해리는 화학물질이 토양 및 퇴적물에 흡착되거나 생물체 세포로 흡수될 때 영향을 미친다.

화학물질의 pK_a 는 크게 두 가지 방법을 이용하여 결정할 수 있다. 하나는 표준 산이나 표준 염기로 양을 알고 있는 물질을 적정하는 방법이고 다른 하나는 이온화된 물질과 비이온화된 물질의 상대농도 및 pH 의존도를 측정하는 방법이다. 본 시험법에서는 3 가지 해리상수 측정 방법(적정법, 분광광도법, 전도도법)을 수록하고 있으며 기본적인 원리 및 시험법에 대한 자세한 사항은 주 1 ~ 주 9를 참조한다.

2.2 시험절차

2.2.1 적정법(Titration method)

본 시험방법은 표준 산 용액 또는 표준 염기 용액으로 시험용액을 적정하는 방법으로 적정 용액을 첨가할 때마다 pH를 측정한다. 당량점에 도달하기 전에 최소 10 회 이상 적정 용액을 가해야 한다. 평형상태에 빨리 도달하면, 전위차계를 사용할 수 있는데 이때 시험물질의 총량과 농도를 정확히 알아야 한다. 주의해야 할 사항은 시험과정에서 이산화탄소를 제거해야 한다는 점이다. 보다 자세한 사항은 주 1 ~ 주 4를 참조한다.

2.2.2 분광 광도법(Spectrophotometric method)

화학물질의 이온화 형태 및 비이온화 형태가 서로 다른 흡광계수를 가질 경우

과장이 나타난다. 여러 pH 범위(시험물질이 전혀 이온화되지 않는 pH 조건, 완전히 이온화되는 pH 조건, 여러 개의 중간 pH 범위)에서 일정한 농도의 시험물질 용액으로부터 UV/VIS 흡수 스펙트럼을 얻는다. 이는 초기 pH가 높은(또는 낮은) 다성분 완충용액에 용해시킨 상대적으로 다량의 시험물질 용액에 진한 산(또는 진한 염기)을 가하거나(주 5) 원하는 pH 범위를 포함하는 다양한 종류의 완충용액 일정 용량에 물, 메탄올 등에 시험물질을 녹인 농축용액(stock solution)을 동량 가하여 얻을 수 있다. 시험물질의 10 % ~ 90 %가 이온화되는 pH 범위에서 최소 5 개의 지점을 선택하여 pH 값과 선택된 과장에서의 흡광도값을 이용하여 pK_a 값을 구할 수 있다. 보다 자세한 시험방법 및 계산법은 주 1을 참고한다.

2.2.3 전도도법(Conductometric method)

셀 상수(Cell constant)를 알고 있는 셀을 이용하여, 약 0.1 M 시험용액의 전도도를 측정한다. 시험용액을 희석하면서 희석 용액의 전도도를 측정한다. 시험용액을 매번 절반 농도로 연속적으로 희석하여 최소 10 배까지 희석하여야 한다. 시험을 수행할 때 이산화탄소가 차단되도록 주의한다.

나트륨 염을 이용하여 유사한 시험을 수행하고 외삽하여 무한 희석 용액(Infinite dilution)의 한계 전도도를 구할 수 있다.

Onsager 방정식을 사용하여 각 용액의 전도율로 해리도를 계산할 수 있고 오스트발트의 희석률(Ostwald dilution law)을 이용하여 다음 식에 따라 해리상수를 계산할 수 있다. 보다 자세한 시험방법 및 계산법은 주 1, 주 6 및 7을 참고한다.

$$K = \frac{\alpha^2 C}{(1 - \alpha)}$$

여기에서, C = 농도(mol/L)

α = 해리 분율

2.3 분석

시험물질의 특성에 따라 적절한 분석방법을 사용하여 분석한다. 이때 측정하고자 하는 시험용액 농도에서 다양한 화학종을 측정하기에 적절한 정도의 충분한 민감도를 갖는 분석방법을 선택한다.

2.4. 시험상의 유의사항

- 2.4.1 본 시험법은 순수한 물질 또는 상업용 등급의 화학물질에 적용할 수 있다. 불순물이 결과에 미치는 영향을 고려하여야 한다.
- 2.4.2 적정법은 물 용해도가 낮은 시험물질에는 적합하지 않다.
- 2.4.3 분광광도법은 시험물질의 해리형, 비해리형의 UV/VIS 흡수 스펙트럼이 다른 경우에만 적용할 수 있다. 또한 용해도가 낮은 화합물이나 산/염기 해리가 안 되는 물질(예 : 착화합물)에 대해서도 적용 가능하다.
- 2.4.4 Onsager 방정식을 따르는 경우, 전도도법을 사용하여 비교적 낮은 농도에서도 해리상수 측정이 가능하며 산/염기 평형이 이루어지지 않는 물질에도 적용 가능하다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 적정법

적정 곡선 상의 10 개 지점에서 pK_a 값을 계산하고 평균 및 표준 편차를 구한다. pH vs 표준 산(또는 염기) 용액량 그래프와 표를 제시한다.

1.2 분광 광도법

각 파장에서 흡광도와 pH를 표로 제시한다. 스펙트럼 중간 데이터값으로부터 최소 5 개 지점에서 pK_a 값을 구하고 평균 및 표준편차를 구한다.

1.3 전도도법

각각의 산 농도에 대한 당량전도 Λ 와 1당량의 산과 0.98 당량의 무탄소 수산화나트륨(Carbon-free sodium hydroxide) 혼합액 각 농도에 대한 당량전도도 Λ 를 구한다. 과량의 산은 가수분해로 인해 다량의 OH기가 생성되는 것을 막는다. $1/\Lambda$ vs \sqrt{C} 그래프를 그리고 영점까지 외삽하여 염의 Λ_0 값을 구한다. 산의 Λ_0 값은 H^+ 와 Na^+ 의 문헌상의 결과를 사용하여 계산할 수 있다. 각 농도에 대해 $\alpha =$

Λ_i / Λ_0 과 $K_a = \alpha^2 C / (1 - \alpha)$ 식으로부터 pK_a 를 계산하고 평균 및 표준편차를 구한다. 이동도 및 활성도를 보정하면 더 나은 K_a 값을 얻을 수 있다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 모든 기초 자료, pK_a 값, 계산법 및 통계 변수(표 형식)

(2) 적정법 : 적정제의 표준화에 대한 구체적인 설명

(3) 분광광도법 : 모든 스펙트럼

(4) 전도도법 : 셀 상수 측정에 대한 구체적인 설명

(5) 시험에 사용된 기술, 분석방법 및 완충용액의 특성

(6) 시험 온도

- 주1) Albert, A. & Sergeant, E.P.: *Ionization Constants of Acids and Bases*, Wiley, Inc., New York, 1962.
- 주2) Nelson, N.H. & Faust, S.D.: Acidic dissociation constants of selected aquatic herbicides, *Env. Sci. Tech.* 3, II, pp. 1186-1188 (1969).
- 주3) ASTM D 1293 - Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- 주4) Standard Method 242. APHA/AWWA/WPCF, *Standard Methods for the Examination of Water and Waste Water*, 14th Edition, American Public Health Association, Washington, D.C., 1976.
- 주5) Clark, J. & Cunliffe, A.E.: Rapid spectrophotometric measurement of ionisation constants in aqueous solution. *Chem. Ind. (London)* 281, (March 1973).
- 주6) ASTM D 1125 - Annual ASTM Standards, Philadelphia, 1974.
- 주7) Standard Method 205 - APHA/AWWA/NPCF.
- 주8) *Handbook of Chemistry and Physics*, 60th ed. CRC-Press, Boca Raton, Florida, 33431 (1980).
- 주9) Preliminary Draft Guideline for Premanufacture Notification EPA, August 18, 1978

제10항 액체의 점도시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 다양한 시험방법을 이용하여 액체 화학물질의 점도를 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의 및 단위

2.1 점도(viscosity)

변형률에 따라 변형되는 동안 응력(stress)을 흡수하는 유체 물질의 특성. 응력이란 변형률을 일으키는 원인으로 전단 응력(shear stress) τ 와 전단 속도 D 는 다음 방정식으로 표시된다.

$$\tau = \eta D$$

여기에서, η = 역학 점도

뉴턴 유체의 경우 점도는 모든 전단 속도에서 일정하며 압력과 온도에 따라 달라진다. 비뉴턴 유체의 경우 점도는 전단 속도에 따라 달라진다.

2.2 동점도(kinetic viscosity)

밀도에 대한 역학 점도(dynamic viscosity)의 비로, 압력을 가하지 않은 모세관 점도계로 측정

2.3 역학 점도의 SI 단위는 $\text{Pa} \cdot \text{s}$ 이다.

2.4 동점도의 SI 단위는 m^2/s 다.

3. 표준물질

시험을 수행할 때마다 표준물질이 필요한 것은 아니다. 표준물질은 시험방법을 보정하는 목적이나 다른 시험방법을 적용하였을 때 그 결과를 비교할 목적으로 이용된다. 표 1에 수록된 표준물질은 IUPAC에서 권장하는 표준물질 목록에서 발췌한 것이다(주 1).

표 1. 표준물질 목록(IUPAC)

화학명	공인값 및 정확도 (20 ℃)	출처 ¹⁾	비고
미네랄 오일류 (Hydrocarbon, partly natural, partly synthetic products)	1 mPa·s ~ 27,000 mPa·s (1.25 mm ² /s ~ 330,000 mm ² /s) 불확도 : ± 0.2 % (4,000 mPa·s 이상에서 ± 0.3 %)	C	뉴턴 유체 서스펜디드 모세관 점도 계로 측정 온도 : 20 ℃ ~ 100 ℃
타입 JS 2.5-2000 (액체 10 종)	2 mPa·s ~ 1800 mPa·s	E	
타입 60 H	60,000 mm ² /s	E	
타입 200 H	200,000 mm ² /s	E	
미네랄 오일	11 mPa·s ~ 1,000 mPa·s ± 0.1 %	D	뉴턴 유체 밀도 및 동적 점도에 대 해서도 공인됨
미네랄 오일	10 ³ mPa·s ~ 10 ⁴ mPa·s ± 0.5 %		
Polyisobutenes	10 ⁴ mPa·s ~ 10 ⁵ mPa·s ± 1.5 %		뉴턴 유체 회전 실린더 점도계법 사용
미네랄 오일 11 종	1.503 mPa·s ± 0.1 % ~ 1,729 mPa· s ± 0.2 %	G	밀도 및 동적 점도에 대 해서도 공인됨 50 ℃, 80 ℃에서의 자료 있음
Polyisobutenes 7 종	4,170 mPa·s ± 1.3 % ~ 589 × 10 ³ mPa·s ± 1.0 %	G	50 ℃, 80 ℃, 100 ℃에 서의 자료 있음

1) 단위는 인증된 국가에서 보고한 단위를 사용하였으며 각 나라는 다음과 같다.

- C : 독일 The Physikalische-Technische Bundesanstalt 33 Braunschweig, Bundesallee 100, Republic of Germany
- D : 헝가리 National Office of Measures Németölgyi ut 37-39, sz. Budapest XII, Hungary
- E : 일본 National Chemical Laboratory for Industry, Ministry of International Trade & Industry, 1-1 Honmachi, Shibuya-ku - Tokyo, 151 Japan
- G : 폴란드 Division of Physico-Chemical Metrology, National Board for Quality Control and Measures - 2, Elektoralna Street, Warsaw, Poland

4. 정도보증 및 정도관리

액체의 점도 측정에 사용되는 다양한 시험방법들의 적용, 측정 범위 및 표준법이 표 2에 수록되어 있다.

표 2. 시험방법별 적용 및 측정범위

측정방법	역학 점도 (mPa·s)	동점도 (mm ² /s)	측정 범위 (mPa·s or mm ² /s)	표준 시험법	항온 오차범위 (℃)
모세관 점도계법 (Capillary viscometer)		X	0.5 ~ 10 ⁵	ISO 3104	± 0.1
플로우 컵 점도계법 (Flow cup)		X	8 ~ 700	ISO 3105	± 0.5
회전 점도계법 (Rotational viscometer)	X		10 ~ 10 ⁹	ISO 32182	± 0.2
회전구 점도계법 (Rolling ball Viscometer)	X		0.5 ~ 10 ⁵	DIN 53015 참조 (국제표준 없음)	± 0.1
낙차구 점도계법 (Drawing ball viscometer)	X		0.5 ~ 10 ⁷	DIN 52007 참조 (국제표준 없음)	± 0.1

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

측정 장치에 대한 요약은 주 2 및 주 3 표준시험법을 참조한다.

1.2 시험조건

점도를 측정할 때는 시험 온도를 함께 측정하여야 한다. 일반적으로 점도는 20 °C와 20 °C보다 높은 온도에서 측정한다(온도 오차범위는 표 2 참조). 각각의 온도에서 최소 2 회 이상 측정한다.

2. 시험방법

2.1 원리

액체 시험물질의 점도 측정 시험방법의 원리는 다음과 같다.

- (1) 중력 하에 모세관을 통한 유동(모세관 점도계, 플로우 컵 점도계)
- (2) 동심형 원통(Concentric cylinder), 원뿔판(Cone-plate), 그리고 평행판(Parallel plate) 사이의 유체 전단(회전 점도계)
- (3) 역학 점도는 액체로 채워진 수직 원통관 또는 경사 원통관 안에 들어 있는 구의 움직임으로 측정하며(Höppler의 회전구 점성계, 낙하구 점성계 등) Höppler 점도계를 사용할 경우에는 동점도를 계산하기 위해 밀도를 알아야 함

유체는 토양에 침투하여 지하수에 위대한 영향을 미칠 수 있으므로 유체의 점도는 환경적으로 중요한 의미를 갖는다. 점도뿐만 아니라 습윤성(Wettability), 혼화성(Miscibility), 용해도 및 표면 장력도 점도와 더불어 중요한 역할을 하므로 함께 고려하여야 한다.

점도가 낮을수록 유체는 토양에 쉽게 스며든다. 실온에서 유체의 최저 역학 점도는 약 0.2 mPa·s로 20 °C에서 물이 지니는 점도의 1/5 수준이다. 점도가 약 10^7 mPa·s 이상인 유체는 점도가 너무 높아서 토양 침투가 불가능하다.

항복값(Yield value)을 갖는 물질(반죽, 연고 등)의 경우에는 동점도가 항복값을 초과할 정도로 낮아도 토양으로 침투되지 않는다. 물질이 수용성이거나 에멀전화될 수 있는 경우 유동 한계(Flow limit)가 있더라도 환경에 피해를 입힐 수 있다.

2.2 시험절차

표 2에 제시된 표준 시험법에 따라 액체 시험물질의 점도를 측정한다. 측정방법에 대한 요약은 주 2를 참조한다.

2.3 시험상의 유의사항

2.3.1 표 2에 수록된 5 가지 시험방법은 뉴턴 유체에 적합한 시험방법이다. 비뉴턴 유체의 점도는 회전 점도계법으로만 측정 가능하다.

2.3.2 회전구 점도계법으로 시험물질의 점도를 측정하기 위해서는 시험물질의 밀도 자료를 확보하여야 한다.

2.3.3 시험물질의 녹는점/녹는범위 및 끓는점/끓는범위에 대한 자료는 본 시험에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

2.3.4 변동 계수는 시험물질의 종류에 따라 달라진다. 변동 계수는 “OECD 실험실간 비교 시험”(Part I, 1979)에서 제시된 평균값으로부터 계산하며 적용 시험법에 대한 구분 없이 변동 계수 범위는 0.004 ~ 0.09이다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험 보고서는 시험에 적용된 표준시험법에 따라 작성하며, 각 시험온도에서 얻어진 개별 수치 및 그 평균값을 제시하여야 한다. 표준시험법으로부터 이탈된 사항이 있는 경우 구체적으로 기술하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험 보고서는 시험에 사용한 표준 시험법에 따라 작성하며 결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 각 시험 온도에서의 점도 수치 및 그 평균값

(2) 표준 시험법에서 벗어난 모든 변동 사항

- 주1) IUPAC Physicochemical Measurements: Catalogue of Reference Materials from National Laboratories, in: *Pure and Applied Chemistry*, Vol. 48, pp. 513-514, Pergamon Press, 1976.
- 주2) W. Wazer, J.W. Lyons, K.J. Kim and R.E. Kolwell, Viscosity and Flow Measurement, *Laboratory Handbook of Rheology*, Inst. Publ. New York - London, 1963
- 주3) 표준 시험법 목록
1. 모세관 점도계법
 - (1) ISO 3104
 - (2) ISO 3105
 - (3) DIN 51550
 - (4) DIN 51562 part 1
 - (5) DIN 51561
 - (6) DIN 51366
 - (7) DIN 51372
 - (8) DIN 51372
 - (9) ASTM D-1200-70
 - (10) ASTM D-2393
 - (11) ASTM D-914 part 25-37
 - (12) ASTM D-88-56
 2. 회전 점도계법
 - (1) ISO 3219-1977
 - (2) DIN 51398
 - (3) DIN 51377
 - (4) DIN 53214
 - (5) DIN 53019 part 1
 - (6) DIN 53229
 - (7) DIN 52312 part 2
 - (8) DIN 53921
 - (9) ASTM D-562-55
 - (10) ASTM D-3346-74
 - (11) ASTM D-2983
 3. Forced ball 점도계법
 - (1) DIN 53015
 - (2) DIN 52007 part 2
 - (3) ASTM D-914 part 25 ~ 3

제11항 수용액의 표면장력시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 다양한 방법을 이용하여 화학물질의 표면장력을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 표면장력(surface tension) : 단위 표면적 당 자유표면에너지

2.2 표면장력의 SI 단위는 N/m 또는 10^{-3} N/m이며 구 cgs 단위로 환산하면 1 N/m는 10^3 dynes/cm, 10^{-3} N/m는 1 dyne/cm에 해당한다.

2.3. 표준물질

시험을 수행할 때마다 표준물질이 필요한 것은 아니다. 표준물질은 시험방법을 보정하는 목적이나 다른 시험방법을 적용하였을 때 그 결과를 비교할 목적으로 이용된다. 다양한 범위의 표면장력을 아우르는 표준물질 목록이 주 1에 수록되어 있다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

일반적으로 상용되는 장력계를 사용한다. 장력계의 구성은 다음과 같다.

- (1) 이동이 가능한 시료 테이블 : 측정 용기를 받치는 용도로 사용되며 힘 측정 시스템과 함께 스탠드에 설치한다.
- (2) 힘 측정 시스템 : 시료 테이블에 설치한다. 힘 측정 오차 범위는 $\pm 10^{-6}$ N 를 초과해서는 안 되며 이는 질량 측정으로 오차 한계 ± 0.1 mg에 해당한다. 대부분의 상업용 장력계는 측정 눈금이 mN/m 단위로 새겨져 있고 0.1 mN/m까지 읽을 수 있는 정확도를 갖는다(주 2).

- (3) 측정 몸체(링) : 링은 약 0.4 mm 두께의 백금-이리듐 철사로 만들어져 있고 평균 원주는 약 60 mm이다. 장력계에 고정하기 위해 링은 금속 핀과 철사로 된 고정 받침대(Mounting bracket)에 수평으로 달려 있다(그림 1). 링이 수평으로 유지되지 않으면 결과를 잘못 읽을 수 있다.
- (4) 측정 용기 : 시험물질을 담은 측정 용기는 온도 조절이 가능한 유리 재질의 용기이다. 측정 용기는 측정하는 동안 시험용액과 용액 표면의 가스상의 온도가 일정하게 유지되고 시료가 증발하지 않도록 만들어져야 한다. 내경이 45 mm 이 내인 원통형 유리 용기를 사용한다.

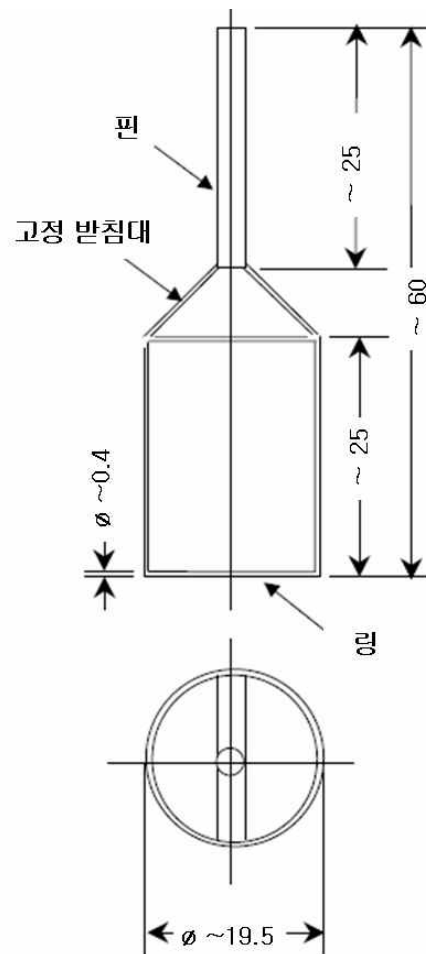


그림 1. 힘 측정 장치(단위 : mm)

1.2 장치의 준비

1.2.1 세척

측정 용기는 주의해서 세척한다. 필요한 경우 뜨거운 크롬 황산액으로 세척한 뒤 시럽 형태의 인산(인산 중량으로 83 % ~ 98 %)으로 세척한다. 수돗물로 깨끗이 헹군 뒤 중성 반응이 나타날 때까지 2 차 증류수로 세척한다. 세척 후 건조하거나 시험용액으로 헹군다.

수용성 물질을 모두 제거하기 위해 링을 물로 깨끗이 세척한 다음 크롬 황산액에 잠시 담갔다가 중성 반응이 나타날 때까지 2 차 증류수로 세척한다. 마지막으로 메탄올 불꽃으로 잠시 가열한다.

실리콘 등과 같이 크롬 황산액 혹은 인산으로 용해되지 않거나 파괴되지 않은 오염 물질은 적절한 유기 용매를 사용하여 제거한다.

1.2.2 영점 조정

측정 장치는 수평 나사를 조절하여 수평이 유지되도록 한다. 장치에 링을 설치하고 액체 표면과 수평이 되는지 확인한다. 이를 위해 액체 표면을 거울과 같은 기능으로 사용할 수 있다. 링을 액체에 담그기 전에 장력계를 '0'으로 조정한다. 분동 혹은 물로 보정할 수 있다.

1.2.3 보정

(1) 분동을 사용하는 방법

질량을 알고 있는 분동(0.1 g ~ 1.0 g)을 링에 설치한다. 모든 기기의 수치(instrumental reading)에 곱해주어야 하는 보정계수 ϕ_a 는 다음과 같다.

$$\phi_a = \frac{\sigma_r}{\sigma_a} \quad , \quad \sigma_r = \frac{mg}{2b} (mN/m)$$

여기에서, m = 저울추(rider)의 질량(g)

g = 중력 가속도(해수면에서, 981 cm/s²)

b = 링의 평균 원주 길이(cm)

σ_a = 라이더를 링에 설치한 후 장력계 측정값

(2) 물을 사용하는 방법

순수한 물을 사용한 보정은 분동을 사용한 보정보다 간단하지만 계면활성제와 같은 미량의 불순물에 의해 물의 표면장력(예, 23 °C에서 72.3 mN/m)이 달라질 위험이 있다. 보정계수 ϕ_b 는 다음과 같으며 이때 측정 온도는 동일하여야 한다.

$$\phi_b = \frac{\sigma_o}{\sigma_g}$$

여기에서, σ_o = 문헌상 물의 표면장력(mN/m)

σ_g = 측정된 물의 표면장력(mN/m)

1.3 시험용액의 조제

시험용액은 증류수로 조제한다. 시험용액의 농도는 포화 용해도의 90 % 농도가 되도록 하며 이 농도가 1 g/L을 초과하는 경우, 1 g/L 농도의 시험용액을 시험에 사용한다. 측정에 방해가 되는 다른 물질에 의한 먼지 및 가스 오염을 막기 위해 보호 덮개를 사용한다.

1.4 시험조건

시험은 20 °C ± 0.5 °C에서 수행하도록 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

본 시험은 액체의 표면에 닿아있는 등자(Stirrup)나 링(Ring)을 표면으로부터 분리하기 위해 수직으로 작용하는 힘을 측정하거나 표면과 평판이 맞닿아 생기는 막을 끌어당기기 위해 평판에 수직으로 작용하는 힘을 측정하는 방법이다. 본 시험법에 수록된 시험방법은 물질의 순도와 상관없이 대부분의 액상 시험물질에 적용할 수 있다. 시험물질의 물용해도, 구조, 가수분해 특성, 임계 미셀 형성 농도에 관한 자료는 본 시험에 유용한 정보를 제공할 수 있다. 자세한 시험방법은 표 1에 수록된 표준 시험법을 참조한다.

표 1. 시험방법 별 표준 시험법

시험방법	표준 시험법
평판 시험법(Plate method)	ISO 304-1985(주 3)
등자 시험법(Stirrup method)	ISO 304-1985(주 3)
링 시험법(Ring method)	ISO 304-1985(주 3)
OECD 링 시험법 (OECD harmonized ring method)	ISO 304-1985(주 3)
	DIN 53914(주 4)
	ASTM-D-1590(주 5)
	ASTM-D-1331(주 6)

2.2 시험절차

시험용액을 거품이 생기지 않도록 조심스럽게 측정 용기에 옮기고 옮긴 시간을 기록한다. 측정 용기를 시험 장치 테이블 위에 놓고 링이 시험용액 표면 아래로 잠길 때까지 측정 용기를 들어올린다. 그 후에 최대 힘에 도달할 때까지 링이 시험용액 표면에서 떨어지도록 약 0.5 cm/min 속도로 테이블 상단을 점차로 낮춘다. 힘은 장력계로 읽는다. 링과 닿아 있는 액체 층은 링과 분리되어서는 안 된다. 첫 번째 측정이 끝난 다음 일정한 표면장력 값에 도달할 때까지 측정을 반복한다.

2.3 시험상의 유의사항

시험물질의 물용해도가 1 mg/L 이하인 경우 표면장력 시험을 수행하지 않아도 된다. 링 시험법은 점도가 200 mPa · s 미만인 수용액에 적용할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

표면장력을 계산하기 위해 먼저 장치에서 읽은 값(mN/m)에 보정 계수 ϕ_a 혹은 ϕ_b 를 곱한다. 이렇게 얻어진 수치는 대략적인 값이므로 보정을 해야 한다. Harkins 및 Jordan은 링의 크기, 액체의 밀도, 표면장력에 따른 보정계수를 경험적으로 산출해내었다(주 7). 각각의 측정값에 대해 Harkins-jordan 표로부터 보정계수를 결정하는 것은 번거로운 일이므로, 수용액에 적용할 수 있는 단순화된 수순을 적용해도 무방하다. 아래 표 2에서 보정된 표면장력을 선택한다. 이 표는 Harkins-jordan 보정에 기초하며 분동 보정이나 물 보정을 거친 측정값에 대한 보정 수치가 제시되어 있다. 물 및 수용액(밀도 $\rho = 1 \text{ g/cm}^3$)을 대상으로 하는 표준 시험법 DIN 53914(주 4)의 표와 유사하고 평균 링 반경이 9.55 mm이고 링 와이어 반경이 0.185 mm인 통상적으로 사용하는 링을 사용한 시험에 적용된다. 보정 과정을 거치지 않은 경우, 다음 식에 따라 표면장력을 계산한다.

$$\sigma = \frac{f \times F}{4\pi R}$$

여기에서, F = 막이 깨지는 순간에 검력계에서 측정된 힘

R = 링의 반경

f = 보정계수(주 7, 주 8)

표 2. 표면장력 측정치의 보정 (수용액에 대해서만 적용 가능)

측정값 σ (mN/m)	보정값 σ (mN/m)	
	물 보정	질량 보정
20	18.1	16.9
22	20.1	18.7
24	22.1	20.6
26	24.1	22.4
28	26.1	24.3
30	28.1	26.2
32	30.1	28.1
34	32.1	29.9
36	34.1	31.8
38	36.1	33.7
40	38.2	35.6
42	40.3	37.6
44	42.3	39.5
46	44.4	41.4
48	46.5	43.4
50	48.6	45.3
52	50.7	47.3
54	52.8	49.3
56	54.9	51.2
58	57.0	53.2
60	59.1	55.2
62	61.3	57.2
64	63.4	59.2
66	65.5	61.2
68	67.7	63.2
70	69.9	65.2
72	72.0	67.2
74	-	69.2
76	-	71.2
78	-	73.2

$\sigma = 1 \text{ g/cm}^3$, $R = 9.55 \text{ mm}$ (평균 링 반경), $r = 0.185$ (링 와이어 반경)

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 시험방법

(2) 사용된 물 또는 용액의 종류

(3) 시험물질의 특성 및 불순물

(4) 측정결과 : 개별 측정값 및 산술평균, 보정 값의 평균

(5) 시험용액의 농도

(6) 시험 온도

(7) 시험용액의 사용 기간(시험용액을 조제하여 사용할 때까지의 소요 시간)

(8) 시험 용기에 시험용액을 옮긴 후 표면장력의 시간의존도에 관한 설명

(9) 결과 해석과 관련된 정보(불순물 및 물리적 상태 등)

- 주1) Pure Appl. Chem. (1976). 48, 511.
- 주2) Gaonkar and Neuman (1984). J. Colloid. Interface Sci. 98, 112.
- 주3) ISO 304 (1985)
- 주4) DIN 53914
- 주5) ASTM D 1590
- 주6) ASTM D 1331
- 주7) Harkins, W.D. and Jordan, H.F. (1930). J. Amer. Chem. Soc., 52, 1751.
- 주8) Fox, H.W., and Chrisman, C.H. (1952). J. Phys. Chem., 56, 284.

제12항 n-옥탄올/물 분배계수시험 : 고속 액체 크로마토그래피법

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 환경 중 거동을 예측하기 위해 n-옥탄올과 물 사이에 분배되는 정도를 측정하는데 목적이 있다. 고성능 액체 크로마토그래피법에 의한 측정범위는 대수치(log P_{ow})가 0 ~ 6 범위인 화학물질에 적용된다.

2. 정의

2.1 분배계수(P)

서로 섞이지 않는 두 용매에 녹아있는 화학물질의 평형 농도비. n-옥탄올/물 분배계수는 수포화 n-옥탄올과 n-옥탄올 포화수에서 화학물질의 평형농도 비율

$$P_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{water}}$$

여기에서, $C_{n-octanol}$ = 수포화 n-옥탄올에서 화학물질의 농도

C_{water} = n-옥탄올 포화수에서 화학물질의 농도

2.2 분배계수는 단위가 없으며 일반적으로 \log_{10} 의 형태로 표현한다.

2.3. 표준물질

측정된 물질의 용량 인자 k와 P_{ow} (n-옥탄올/물 분배계수) 값을 연관시키기 위해서는 최소 6 개 지점을 포함하는 보정 그래프를 그려야 한다. 시험물질과 구조적으로 관련된 표준물질을 선택하며 표준물질의 log P_{ow} 값은 시험물질의 log P_{ow} 값을 포함하는 범위이어야 하며 한다. 최소 1 개의 표준물질의 P_{ow} 값은 시험 물질의 P_{ow} 값보다 크고 다른 표준물질의 P_{ow} 값은 시험물질의 P_{ow} 값보다 작아야 한다. 보정에 사용되는 표준물질의 log P_{ow} 값은 신뢰할만한 실험값이어야 한다. 예외적인 경우에는 외삽법을 사용한다. 단, 신뢰할 수 있는 실험 자료가 없

는 $\log P_{ow}$ 값이 4 이상인 시험물질에 대해서는 계산 값을 이용한다. 외삽법으로 구한 값을 사용하는 경우 한계 값을 인용해야 한다.

다양한 종류의 화학물질에 대한 방대한 범위의 $\log P_{ow}$ 값이 주 1과 주 2에 제시되어 있다. 구조적으로 관련 있는 화학물질의 분배계수 자료가 없는 경우 다른 표준물질로 얻은 보다 일반적인 보정 값을 사용할 수 있다. 권장 표준물질과 그 P_{ow} 값은 표 1과 같다. 이온화 물질의 경우 표 1에 제시된 수치를 비이온화 형태에 적용할 수 있다.

표 1. 권장 표준물질 및 그 $\log P_{ow}$ 값

	CAS 번호	표준 물질	$\log P_{ow}$	pK_a
1	78-93-3	2-Butanone (Methylethylketone)	0.3	
2	1122-54-9	4-Acetylpyridine	0.5	
3	62-53-3	Aniline	0.9	
4	103-84-4	Acetanilide	1.0	
5	100-51-6	Benzyl alcohol	1.1	
6	150-76-5	4-Methoxyphenol	1.3	$pK_a = 10.26$
7	122-59-8	Phenoxyacetic acid	1.4	$pK_{aa} = 3.12$
8	108-95-2	Phenol	1.5	$pK_a = 9.92$
9	51-28-5	2,4-Dinitrophenol	1.5	$pK_a = 3.96$
10	100-47-0	Benzonitrile	1.6	
11	140-29-4	Phenylacetoneitrile	1.6	
12	589-18-4	4-Methylbenzyl alcohol	1.6	
13	98-86-2	Acetophenone	1.7	
14	88-75-5	2-Nitrophenol	1.8	$pK_{aa} = 7.17$
15	121-92-6	3-Nitrobenzoic acid	1.8	$pK_a = 3.47$
16	106-47-8	4-Chloroaniline	1.8	$pK_a = 4.15$
17	98-95-3	Nitrobenzene	1.9	
18	104-54-1	Cinnamyl alcohol (Cinnamic alcohol)	1.9	
19	65-85-0	Benzoic acid	1.9	$pK_a = 4.19$
20	106-44-5	p-Cresol	1.9	$pK_a = 10.17$
21	140-10-3	Cinnamic acid	2.1	$pK_a = 3.89(cis)$ $pK_a = 4.44(trans)$
22	100-66-3	Anisole	2.1	
23	93-58-3	Methyl benzoate	2.1	
24	71-43-2	Benzene	2.1	
25	99-04-7	3-Methylbenzoic acid	2.4	$pK_a = 4.27$

26	106-48-9	4-Chlorophenol	2.4	$pK_a = 9.1$
27	79-01-6	Trichloroethylene	2.4	
28	1912-24-9	Atrazine	2.6	
29	93-89-0	Ethyl benzoate	2.6	
30	1194-65-6	2,6-Dichlorobenzonitrile	2.6	
31	535-80-8	3-Chlorobenzoic acid	2.7	$pK_a = 3.82$
32	108-88-3	Toluene	2.7	
33	90-15-3	1-Naphthol	2.7	$pK_a = 9.34$
34	608-27-5	2,3-Dichloroaniline	2.8	
35	108-90-7	Chlorobenzene	2.8	
36	1746-13-0	Allyl phenyl ether	2.9	
37	108-86-1	Bromobenzene	3.0	
38	100-41-4	Ethylbenzene	3.2	
39	119-61-9	Benzophenone	3.2	
40	92-69-3	4-Phenylphenol	3.2	$pK_a = 9.54$
41	89-83-8	Thymol	3.3	
42	106-46-7	1,4-Dichlorobenzene	3.4	
43	122-39-4	Diphenylamine	3.4	$pK_{aa} = 0.79$
44	91-20-3	Naphthalene	3.6	
45	93-99-2	Phenyl benzoate	3.6	
46	98-82-8	Isopropylbenzene	3.7	
47	88-06-2	2,4,6-Trichlorophenol	3.7	$pK_a = 6$
48	92-52-4	Biphenyl	4.0	
49	120-51-4	Benzyl benzoate	4.0	
50	88-85-7	2,4-Dinitro-6-sec-butylphenol	4.1	
51	120-82-1	1,2,4-Trichlorobenzene	4.2	
52	143-07-7	Dodecanoic acid	4.2	$pK_a = 5.3$
53	101-84-8	Diphenyl ether	4.2	
54	85-01-8	Phenanthrene	4.5	
55	104-51-8	n-Butylbenzene	4.6	
56	103-29-7	Dibenzyl	4.8	
57	3558-69-8	2,6-Diphenylpyridine	4.9	
58	206-44-0	Fluoranthene	5.1	
59	603-34-9	Triphenylamine	5.7	
60	50-29-3	DDT	6.5	

2.4 정도보증 및 정도관리

2.4.1 반복성

동일한 표준물질을 사용하여 동일한 조건에서 반복 측정하였을 때 $\log P_{ow}$ 값의 오차 범위는 ± 0.1 이내이어야 한다.

2.4.2 재현성

시험물질의 $\log k$ 와 $\log P_{ow}$ 값 사이의 상관계수 R 은 약 0.9로 이는 $\log P_{ow} \pm 0.5$ 의 옥탄올/물 분배계수에 해당한다. 연구실간의 비교 시험 결과, HPLC법을 사용하였을 때 진동 플라스크법으로 측정한 값의 ± 0.5 오차 범위 내에서 $\log P_{ow}$ 값을 얻을 수 있는 것으로 밝혀졌다(주 3). 다른 비교 자료는 주 4 ~ 주 8에 수록되어 있다. 구조적으로 유사한 표준물질을 이용한 상관관계 그래프가 가장 정확한 결과를 제시한다(주 9).

II. 시험

P_{ow} 는 화학물질의 환경 내 거동을 연구하는데 있어서 중요한 파라미터이다. 어류에서 비이온 화학물질의 P_{ow} 는 이들 물질의 생물농축과 밀접한 관계에 있는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라, P_{ow} 는 토양과 퇴적물에서 흡착을 예측하는데 중요한 파라미터이며 광범위한 생물학적 영향을 예측하는 구조-활성 상관관계(QSAR, Quantitative Structure Activity Relationship)를 정립하는데 유용한 것으로 알려져 있다.

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 고속 액체 크로마토그래피(HPLC)

저진동 펌프(Low pulse pump) 및 적절한 검출 장치가 장착된 HPLC를 이용한다. UV 검출기(210 nm)나 RI 검출기는 다양한 화학물질에 사용될 수 있다. 정지상에 극성 원자단(Polar group)이 존재하는 경우, HPLC 컬럼 기능을 심각하게 손상시킬 수 있으므로 극성 원자단이 최소로 존재하게 한다(주 10). 상용화된 초

미립자 역상 컬럼(Microparticulate reverse-phase packing) 혹은 이미 충전된 컬럼을 사용할 수 있다. 가드 컬럼은 주입 장치와 분석 컬럼 사이에 위치한다.

1.1.2 이동상

용출용매는 HPLC용 메탄올과 증류수 또는 탈이온수를 사용하여 조제하며 사용 전에 가스를 제거한다. 일정한 조성의 단일용매를 사용하여 분리한다(등용매 분리). 물 함유량이 최소 25 %가 되는 메탄올/물 혼합 용매를 사용한다. 1 mL/min 유속으로 한 시간 이내에 $\log P_{ow}$ 값이 6인 시험물질을 분리하기 위해서는 메탄올/물 혼합용매를 3 : 1(v/v) 비율로 사용하는 것이 적절하다. $\log P_{ow}$ 값이 6 이상인 물질의 경우, 이동상의 극성을 줄이거나 컬럼 길이를 줄여 시험물질의 용출시간(표준물질의 용출시간)을 단축시킨다.

시험물질과 표준물질은 검출이 가능할 만큼 충분한 농도로 이동상에 녹아야 한다. 첨가물은 컬럼 특성을 변질시킬 수 있기 때문에 예외적인 경우에서만 사용하며 시험물질과 표준물질의 머무름 시간에 영향을 미치지 않는지 확인해야 한다. 메탄올-물 혼합용매가 적절치 않은 경우 다른 유기 용매-물 혼합용매(예: 에탄올-물, 아세토니트릴-물, 혹은 이소프로필 알콜(2-프로파놀)을 사용할 수 있다.

시험물질이 이온화할 수 있는 물질인 경우 용출 용매의 pH가 중요하다. 용출 용매의 pH는 컬럼이 작동하는 pH 범위인 2 ~ 8 사이이어야 하며 완충액을 사용하는 것이 좋다. 일부 유기상 완충액 혼합용매를 사용하였을 때 발생될 수 있는 염 침전이나 컬럼 기능 저하 현상이 발생되지 않도록 주의하여야 한다. 알칼리성 이동상을 사용하는 경우 컬럼 기능이 빠르게 저하될 수 있으므로 pH 8 이상인 실리카 정지상을 이용하는 것은 바람직하지 않다.

1.1.3 용질

시험물질 및 표준물질은 크로마토그램에서 각 물질에 피크를 설정할 수 있을 정도로 충분히 순도가 높아야 한다. 시험이나 보정 목적으로 사용되는 물질은 가능한 한 이동상에 용해돼야 한다. 시험물질 및 표준물질을 이동상이 아닌 다른 용매에 녹인 경우 주입하기 전에 이동상으로 최종 희석을 한다.

1.2 시험조건

측정 중 시험온도 편차는 ± 1 °C를 유지해야 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

역상 HPLC법은 실리카에 결합된 긴 탄화수소 사슬(예 : C8, C18 등)을 포함하는 고정상으로 채워진 분석용 컬럼을 이용한다. 컬럼에 주입된 시험물질은 이동상에 의해 컬럼을 따라 이동하면서 이동상 용매와 탄화수소 고정상 사이에서 분리된다. 탄화수소-물 분배계수 비율에 따라 수용성 화학물질이 먼저 분리되고 지용성 화학물질은 나중에 분리된다.

역상 HPLC법을 사용하여 $\log P_{ow}$ 범위가 0 ~ 6 사이인 분배계수를 추정할 수 있지만 예외적인 경우 변형된 이동상을 이용하여 $\log P_{ow}$ 범위가 6 ~ 10 사이인 분배계수도 추정할 수 있다(주 3). 이 방법은 강산, 강염기, 금속 화합물, 용출액과 반응하는 물질 혹은 계면활성제에는 적합하지 않다. 이온화하는 물질의 경우 그 물질의 비이온화 형태(유리 산 또는 유리 염기)에서 분배계수를 측정하며 유리 산의 경우는 유리 산의 pK_a 값 이하의 pH 값을 갖는 완충용액을, 유리 염기의 경우는 유리 염기의 pK_a 값 이상의 pH 값을 갖는 완충용액을 사용한다. 이온화하는 물질의 분배계수를 구하는 다른 시험 방법으로는 pH 측정법이 있다(주 11). 환경 유해성 분류 또는 환경 위해성 평가를 목적으로 $\log P_{ow}$ 값을 구하는 경우에는 일반적인 자연 환경에서의 pH 범위, 즉 5 ~ 9 사이의 pH 범위 내에서 시험을 실시해야 한다.

2.2 시험절차

2.2.1 분배계수 예비추정

필요한 경우 시험물질의 분리계수를 보정법(부록 1)을 사용하거나 순수한 용매에 대한 시험물질의 용해도 비율을 이용하여 추정할 수 있다.

2.2.2 불감시간(t_0 , dead time) 측정

불감시간 t_0 는 컬럼에 체류하지 않는 유기 화합물질(티오우레아(thiourea)나 포름아마이드(formamide) 등)을 이용하여 측정할 수 있다. 보다 정확한 불감시간은 머무름 시간 측정값이나 약 7 종류의 동족체(예, n-알킬메틸케톤(n-alkyl methyl ketones))를 사용하여 측정할 수 있다(주 12). 아래 식에서 절편 $(1 - A)t_0$ 과 기울기 A로부터 불감 시간 t_0 를 구할 수 있다.

$$t_R(n_C + 1) = A \cdot t_R(n_C) + (1 - A)t_0$$

여기에서, n_c = 탄소 원자 수

$$A = k(n_C + 1)/k(n_C)$$

2.2.3 회귀 방정식

시험물질의 예상 $\log P_{ow}$ 값과 유사한 $\log P_{ow}$ 값을 갖는 적절한 표준물질을 이용하여 $\log P_{ow}$ 에 대한 $\log k$ 의 상관 그래프를 그린다. 6 ~ 10 사이의 $\log P_{ow}$ 값을 갖는 표준물질을 동시해 주입하고 머무름 시간을 측정한다. 가능하면 검출 시스템에 연결된 기록 적분기(recording integrator)를 이용한다. 컬럼 기능의 변화를 설명할 수 있도록 정기적으로(최소 하루에 한번) 회귀 방정식을 구한다.

2.2.4 시험물질의 P_{ow} 측정

시험물질 최소량을 컬럼에 주입하고 머무름 시간을 2 회 반복 측정한다. 시험물질의 분배계수는 보정 그래프에 계산된 용량인자를 내삽하여 산출한다. 분배계수가 아주 낮거나 아주 높은 경우에는 외삽법을 사용하는데 이러한 경우 회귀선의 신뢰도 한계에 주의한다. 시험물질의 머무름 시간이 표준물질에서 얻은 머무름 시간을 벗어날 경우에 한계 값을 인용한다.

2.3 시험상의 유의사항

2.3.1 P_{ow} 값은 온도, pH 및 이온 세기에 따라 달라질 수 있으므로 P_{ow} 결과를 정확히 해석하기 위해서는 이러한 조건들을 명확히 밝혀야 한다. 새로운 OECD 지

참서 122(이온 물질에 대한 pH 측정법)에 따라 이온화될 수 있는 물질의 P_{ow} 값을 측정할 수 있지만(주 11) 일반적인 환경의 pH에서는 HPLC법을 이용하여 P_{ow} 값을 측정하는 것이 좋다.

2.3.2 시험물질의 해리상수, 구조식, 이동상에서의 용해도 및 가수분해 자료는 본 시험에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

머무름 시간(Retention time)은 다음과 같이 용량인자 k 로 표현된다.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0}$$

여기에서 t_R 은 시험물질의 머무름 시간이고 t_0 은 불감시간(Dead time), 즉 용매 분자가 컬럼을 통과하는데 소요되는 평균 시간이다. 정량분석은 필요하지 않고 머무름 시간만 측정하면 된다.

머무름 시간을 측정한 뒤 용량인자 k 를 결정하고 다음 방정식에 대입하여 시험 물질의 옥탄올/물 분배계수를 구한다.

$$\log P_{ow} = a + b \times \log k$$

위 방정식은 표준물질의 $\log k$ 값에 대한 $\log P_{ow}$ 값을 선형 회귀 분석하여 구할 수 있으며 여기에서 a 와 b 는 선형 회귀 계수이다.

불순물로 인해 피크 지정이 불확실하여 결과 해석이 어려울 수 있다. 분리되지 않은 띠(unresolved band)를 보이는 혼합물의 경우에는 $\log P_{ow}$ 값의 상한선 및 하한선과 각 $\log P_{ow}$ 피크의 면적(%)을 기록한다. 동족체 그룹인 혼합물의 경우에는 $\log P_{ow}$ 의 가중평균값을 기록하는데(주 13), 이는 P_{ow} 값과 이에 상응하는 피크 면적(%)으로부터 산출한다(주 14). 총 피크 면적의 5 % 이상에 해당하는 모든 피크는 가중 평균을 계산할 때 고려하여야 한다(주 15).

$$weighted\ average\ log P_{ow} = \frac{\sum_i (log P_{owi})(area \%_i)}{total\ peak\ area\ \%} = \frac{\sum_i (log P_{owi})(area \%_i)}{\sum_i area \%}$$

log P_{ow}의 가중 평균값은 화학물질 또는 동족체(즉, 알칸류)로 구성된 혼합물(즉, 탈유)에 대해서만 유효하다. 시험에 사용된 분석 검출기가 혼합물에 포함된 모든 물질에 대해 동일한 감도를 갖고 혼합물을 적절히 분리할 수 있는 경우에만 분석 결과는 의미를 갖는다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.5 시험결과 : (1) 분배계수를 추정된 경우 추정 값 및 추정에 사용된 방법 ; 계산 방법이 사용된 경우 전반적인 설명(데이터베이스 확인 및 fragment 선택에 대한 상세 설명)

(2) 시험물질 및 표준물질(순도, 구조식, CAS 번호)

(3) 장비 및 작동 조건에 대한 설명 : 분석 컬럼, 가드 컬럼

(4) 이동상, 검출 수단, 온도범위, pH

(5) 크로마토그램

(6) 불감 시간 및 측정법

(7) 보정에 사용된 표준물질에 대한 머무름 시간 데이터 및 log P_{ow} 문헌 값

- (8) 회귀선($\log k$ vs $\log P_{ow}$), 상관계수 및 신뢰구간
- (9) 시험물질에 대한 평균 retention data 및 $\log P_{ow}$ 값
- (10) 혼합물인 경우 지정된 분획의 크로마토그램
- (11) $\log P_{ow}$ 피크 넓이(%)에 관한 $\log P_{ow}$ 값
- (12) 회귀선을 사용한 계산
- (13) 적절한 경우, $\log P_{ow}$ 의 가중평균 계산 값

- 주1) C. Hansch and A. J. Leo. (1979). Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology. John Willey, New York.
- 주2) C. Hansch, chairman; A.J. Leo, dir. (1982). Log P and Parameter Database: A tool for the quantitative prediction of bioactivity - Available from Pomona College Medical Chemistry Project, Pomona College, Claremont, California 91711.
- 주3) C.V. Eadsforth. (1986). Application of Reverse H.P.L.C. for the Determination of Partition Coefficient. 17, 311.
- 주4) H. Ellgehausen, C. D'Hondt and R. Fuerer. (1981). Reversed-phase chromatography as a general method for determining octan-1-ol/water partition coefficients. *Pesticide Science* 12, 219.
- 주5) B. McDuffie. Estimation of Octanol Water Partition Coefficients for Organic Pollutants Using Reverse Phase High Pressure Liquid Chromatography. (1981). 10, 73.
- 주6) L.O. Renberg, S.G. Sundstroem and K. Sundh-Nygård. (1980) Partition coefficients of organic chemicals derived from reversed-phase thin-layer chromatography. Evaluation of methods and application on phosphate esters, polychlorinated paraffins and some PCB-substitutes. 9, 683.
- 주7) W.E. Hammers, G.J.Meurs and C.L. De-Ligny. (1982). Correlations between liquid chromatographic capacity ratio data on Lichrosorb RP-18 and partition coefficients in the octanol-water system. 247, 1.
- 주8) J.E. Haky and A.M. Young. (1984) Evaluation of a simple HPLC correlation method for the estimation of the octanol-water partition coefficients of organic compounds. 7, 675.
- 주9) S. Fujisawa and E. Masuhara. (1981). Determination of Partition Coefficients of Acrylates Methacrylates and Vinyl Monomers Using High Performance Liquid Chromatography. 15, 787.
- 주10) R. F. Rekker, H. M. de Kort. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. - *Chim. Ther.* 14, 479.
- 주11) OECD Guideline for Testing of Chemicals - - Partition Coefficient (n-octanol/water): pH-metric Method for Ionisable Substances. Draft Guideline 122. November 2000.
- 주12) G.E. Berendsen, P.J. Schoenmakers, L. de Galan, G. Vigh, Z. Varga-Puchony, and J. Inczédy. (1980) On determination of hold-up time in reversed-phase liquid chromatography. 3, 1669.

- 주13) OSPAR (1995). "Harmonised Offshore Chemicals Notification Format (HOCFN) 1995", Oslo and Paris Conventions for the Prevention of Marine Pollution Programmes and Measures Committee (PRAM), Annex 10, Oviedo, 20 - 24 February 1995.
- 주14) M. Thatcher, M. Robinson, L. R. Henriquez and C. C. Karman. (1999). An ser Guide for the Evaluation of Chemicals Used and Discharged Offshore, A CIN Revised CHARM III Report 1999. Version 1.0, 3. August.
- 주15) E. A. Vik, S. Bakke and K. Bansal. (1998). Partitioning of Chemicals. Important Factors in Exposure Assessment of Offshore Discharges..□Vol. 13, pp. 529-537.

부록 1. P_{ow} 계산법

I. 개요

간략한 P_{ow} 계산법을 소개한다. 좀더 자세한 내용은 주 1과 2를 참조한다. 계산된 P_{ow} 값은 다음에 사용된다.

- (1) 시험방법을 결정할 때 : $\log P_{ow}$ 값이 $-2 \sim 4$ 사이인 경우 진동 플라스크법, $0 \sim 6$ 사이인 경우 HPLC법을 선택
- (2) HPLC법에 사용될 조건을 선택할 때(표준물질, 메탄올/물 비율)
- (3) 시험을 통해 얻은 측정값의 타당성을 검토할 때
- (4) 시험이 불가능한 경우 추정 값을 제공할 때

II. 원리

P_{ow} 계산법은 신뢰할만한 $\log P_{ow}$ 증가가 알려진 적절한 하부구조로 분자가 분절되는 이론에 근거한다. 분절값 및 분자 내의 상호작용에 대한 수정 인자를 합해, $\log P_{ow}$ 값을 구한다. 분절 상수 및 수정 인자는 주 1 ~ 6을 참고한다. 일부는 정기적으로 갱신된다(주 3).

III. 계산값에 대한 신뢰도

일반적으로 대상물질의 구조가 복잡할수록 계산법의 신뢰도는 감소한다. 분자량이 작고 1 개 혹은 2 개의 작용기를 갖는 분자의 경우, 다른 분절 방법으로 얻은 결과와 측정값 사이의 \log 값의 예상 편차는 $0.1 \sim 0.3$ 사이이다. 오차 한계는 사용된 분절 상수의 신뢰성, 분자 내의 상호작용(즉, 수소 결합)을 감지할 수 있는 능력, 수정 항의 올바른 사용에 따라 달라진다. 이온화하는 화학물질의 경우, 전하와 이온화도를 고려해야 한다(주 10).

IV. Fujita-Hansch π 법

Fujita 등이 최초로 제안한 소수성 치환 상수(hydrophobic substituent constant) π 는 다음과 같이 정의된다(주 7).

$$\pi X = \log P_{ow}(PhX) - \log P_{ow}(PhH)$$

여기서, PhX는 방향족 유도체고, PhH는 모화합물(parent substance)이다.

$$\begin{aligned}\pi Cl &= \log P_{ow}(C_8H_5Cl) - \log P_{ow}(C_6H_6) \\ &= 2.84 - 2.13 \\ &= 0.71\end{aligned}$$

π 법은 주로 방향족 물질에 적용한다. 다수의 치환기에 대한 π 값은 주 4와 주 5를 참고한다.

V. Rekker법

Rekker법을 사용하여(주 8) 다음과 같이 $\log P_{ow}$ 값을 계산한다.

$$\text{Log} P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j (\text{interaction terms})$$

여기서, a_i 는 분자 내에서 발생하는 분절 빈도수이고, f_i 는 분절 $\log P_{ow}$ 증가 값이다. 소위 매직상수라고 불리는 상호작용 항은 하나의 상수 C_m 의 중복 적분으로 나타낸다. 다중 회귀 분석을 이용하여 825 개 화학물질에 대한 1,054 개의 P_{ow} 실험값을 구할 수 있다(주 6, 8). 상호작용 항은 따로 마련된 규칙에 따라 산출한다(주 6, 8, 9).

VI. Hansch-Leo법

Hansch-Leo법을 사용하여 다음과 같이 $\log P_{ow}$ 값을 계산한다(주 4).

$$\text{Log} P_{ow} = \sum_i a_i f_i + \sum_j b_j F_j b_j$$

여기서, f_i 는 분절 상수, F_j 는 수정 인자, a_i 와 b_j 는 각각의 발생 빈도이다. 원자 및 작용기의 분절 값 및 수정 항 F_j 의 목록은 시행착오를 겪어가며 P_{ow} 실험값으로부터 유도된 것이다. 수정 항은 몇몇 다른 분류들로 나누어진다(주 1, 4). 모든 규칙과 수정 항을 고려하기 위해 소프트웨어 패키지가 개발되었다(주 3).

VII. 연계(Combined)법

복합 분자가 신뢰할만한 $\log P_{ow}$ 값을 표(주 3, 4)나 측정을 통해 얻을 수 있는 하부구조로 나뉜다면, 복합 분자의 $\log P_{ow}$ 값을 계산하는 것이 상당히 수월해진다. 이러한 분절들(즉, 이중 환 화합물, 안트라퀴논, 아조벤젠)은 Hansch- π 값 혹은 Rekker나 Leo 분절상수와 연계될 수 있다.

VIII. 주의

1. 계산법은 보정 인자를 고려해야만 할 때 일부 혹은 전체가 이온화되는 화합물질에만 적용한다.
2. 분자 내에 수소 결합이 존재한다고 추정되는 경우, 이에 상응하는 보정항(log 값은 약 +0.6 ~ +1.0)이 추가되어야 한다(주 1). 이러한 결합의 존재는 입체 모델이나 분광 자료를 통해 확인할 수 있다.
3. 대상물질이 몇 가지 호변 형태(tautomeric form)를 취하는 경우, 가장 대표적인 형태의 것을 계산 근거로 사용한다.
4. 분절 상수 목록 개정은 신중을 기해서 따른다.

IX. 계산 방법 참고문헌

- (1) W.J. Lyman, W.F. Reehl and D.H. Rosenblatt (ed.). Handbook of Chemical Property Estimation Methods, McGraw-Hill, New York (1982).
- (2) W.J. Dunn, J.H. Block and R.S. Pearlman (ed.). Partition Coefficient, Determination and Estimation, Pergamon Press, Elmsford (New York) and Oxford (1986).
- (3) Pomona College, Medicinal Chemistry Project, Claremont, California 91711, USA, Log P Database and Med. Chem. Software (Program CLOGP-3).
- (4) C. Hansch and A.J. Leo. Substituent Constants for Correlation Analysis in Chemistry and Biology, John Wiley, New York (1979).
- (5) Leo, C. Hansch and D. Elkins. (1971) Partition coefficients and their uses., 71, 525 (1971).
- (6) R. F. Rekker, H. M. de Kort. The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. *Eur. J. Med. Chem., - Chim. Ther.* 14, 479 (1979)
- (7) Toshio Fujita, Junkichi Iwasa & Corwin Hansch . A New Substituent Constant, , Derived from Partition Coefficients. *J. Amer. Chem. Soc.* 86, 5175 (1964)
- (8) R.F. Rekker. The Hydrophobic Fragmental Constant, Pharmacochemistry Library, Vol. 1, Elsevier, New York (1977).
- (9) C.V. Eadsforth and P. Moser. (1983). Assessment of Reverse Phase Chromatographic Methods for Determining Partition Coefficients. 12, 1459.
- (10) R.A. Scherrer. ACS - Symposium Series 255, p. 225, American Chemical Society, Washington, D.C. (1984).

제13항 n-옥탄올/물 분배계수시험 : 완속교반법

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 환경 중 거동을 예측하기 위해 화학물질이 n-옥탄올과 물 사이에 분배되는 정도를 측정하는데 목적이 있다. 완속교반법에 의한 측정범위는 분배계수의 대수치(log P_{ow})가 5 ~ 8.2 사이의 강한 소수성 화학물질에 적용된다.

2. 정의

2.1 분배계수(P)

서로 섞이지 않는 두 용매에 녹아있는 화학물질의 평형 농도비. n-옥탄올/물 분배계수(P_{ow})는 수포화 n-옥탄올과 n-옥탄올 포화수에서 화학물질의 평형농도 비율

$$P_{ow} = \frac{C_{n-octanol}}{C_{water}}$$

여기에서, $C_{n-octanol}$ = 수포화 n-옥탄올에서 화학물질의 농도

C_{water} = n-옥탄올 포화수에서 화학물질의 농도

2.2 분배계수는 단위가 없으며 일반적으로 \log_{10} 의 형태로 표현한다. P_{ow} 값은 온도에 따라 달라지므로 측정온도를 함께 표시한다.

II. 시험

P_{ow} 는 화학물질의 환경 내 거동을 예측하고 환경 위해성을 평가하는데 있어서 중요한 파라미터이다. 어류에서 비활성 유기물질의 P_{ow} 는 이들 물질의 생물농축과 밀접한 관계에 있는 것으로 알려져 있다. 또한 P_{ow} 는 토양과 퇴적물에서 화학물질의 흡착 뿐 아니라 어류 독성과 관련되는 것으로 알려져 있다(주 1).

1. 시험의 준비

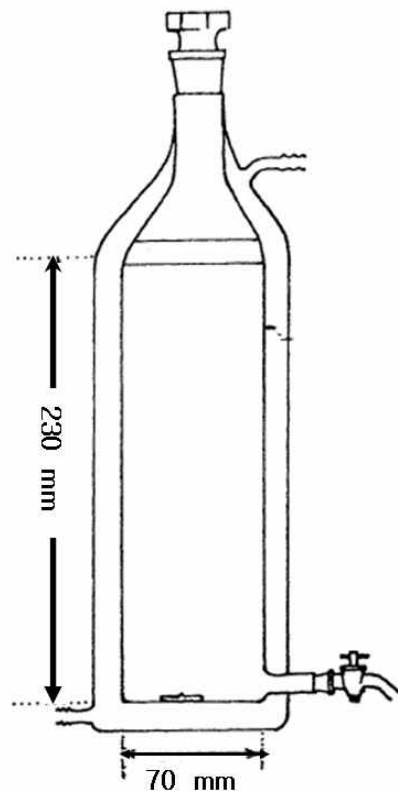
1.1 장치 및 기구

1.1.1 자석 교반기 및 테플론 코팅된 자석 교반 막대

1.1.2 분석 장치

1.1.3 바닥에 마개가 있는 교반 용기

시험물질의 예상 $\log P_{ow}$ 값과 검출한계에 따라 시험물질의 추출 및 분석에 필요한 충분한 시료량이 확보될 수 있도록 1 L 이상의 동일한 기하학적 구조를 가진 용기를 사용한다. <그림>에 1 L 용량의 유리 교반 용기의 모식도가 제시되어 있다. 다른 크기의 교반 용기를 사용할 때도 동일한 비율이 유지되어야 한다.



<그림> 완속교반 시험용 유리자켓 시험용기의 예

예상 최소 소요량, 검출한계, 예상 $\log P_{ow}$ 및 수용해도는 <부록>에 제시되어 있다. 이는 n-옥탄올과 물에 대한 용해도 비율과 $\log P_{ow}$ 값의 상관관계에 기초한 것이다(주 2).

$$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.41$$

$$\text{여기에서, } SR(\text{Solubility Ratio}) = \frac{S_{oct}}{S_w} (\text{몰 농도})$$

$$S_{oct} = \text{n-옥탄올에 대한 용해도(몰 농도)}$$

$$S_w = \text{물에 대한 용해도(몰 농도)}$$

<부록>에 제시된 식에 따라 계산한 수용해도를 최초 추정 값으로 간주한다. 사용자가 임의로 소수성과 용해도간의 상관성을 보다 잘 나타내는 관계식을 사용하여 물용해도를 추정할 수 있다. 고체 시험물질의 경우 용해도를 예측할 때 녹는점을 포함하는 것이 좋다. 변형된 관계식을 사용할 경우 옥탄올에 대한 용해도 계산식이 타당하다는 것을 확인하여야 한다.

1.1.4 항온장치

완속 교반 시에 항온을 유지할 수 있는 장치

1.1.5 시험용기

시험용기 표면에 시험물질의 흡착을 최소화할 수 있는 불활성 재질의 용기

1.2 용매의 조제 및 시험물질용액의 조제

1.2.1 n-옥탄올

시판되는 최고 순도(99 % 이상)의 n-옥탄올을 사용한다. n-옥탄올은 산, 염기 및 물로 추출하고 건조시키거나 증류하는 방법으로 정제한다.

1.2.2 물

유리나 석영재질의 증류장치로 증류한 물이나 정화 장치를 거친 물 또는 HPLC 급 물을 사용한다. 증류된 물은 0.22 μm 필터로 여과한 뒤 사용하며 바탕실험을 수행하여 시험물질을 방해할 수 있는 불순물이 존재하는지 여부를 확인해야 한다. 유리섬유 필터를 사용하는 경우에는 400 °C에서 최소한 3 시간 이상 구워서 사용한다.

1.2.3. 정제한 n-옥탄올과 물을 충분히 큰 시험용기에 넣고 평형상태에 도달

하도록 2 일 동안 완속 교반하여 시험 전에 두 상이 상호 포화되도록 한다.

1.2.4 시험물질용액 제조

적절한 시험물질 농도를 선정하여 수포화 n-옥탄올에 시험물질을 녹인다. 시험물질의 농도는 각각의 상에서 용해도의 70 %(최대 0.1 M)를 넘지 않도록 한다(주 3).

예상 $\log P_{ow}$ 값이 5를 넘는 경우 n-옥탄올 용액에 부유하는 고체 시험물질이 없어야 하며 다음의 과정에 따라 시험용액을 조제한다.

- (1) 수포화 n-옥탄올에 시험물질을 녹인다.
- (2) 고체 시험물질이 가라앉도록 충분한 시간동안 방치하면서 시험물질의 농도를 모니터링 한다.
- (3) 시험물질의 농도가 안정된 값에 도달하면 적당량의 n-옥탄올로 희석한다.
- (4) 희석된 시험물질용액의 농도를 측정하고 측정값이 희석치와 동일하면 완속 교반 시험을 수행한다.

1.3 시험 및 측정조건의 설정

1.3.1 시험조건

1.3.1.1 n-옥탄올/물 최적 부피비 산정

다음의 사항을 고려하여 물과 n-옥탄올의 부피를 산정한다.

- (1) n-옥탄올과 물에서의 정량 한계
- (2) 수층 시료의 예비 농축 인자
- (3) n-옥탄올/물에서 채취한 시료의 부피
- (4) 예상 농도

1.3.1.2 최소 3 개의 독립된 완속 교반 시험을 수행하여 각각의 시험용기에서 P_{ow} 값을 측정한다.

1.3.1.3 완속 교반 시스템에서 n-옥탄올 층으로부터 시료를 채취할 때 층이 교란되지 않도록 충분한 두께(> 0.5 cm)가 되도록 n-옥탄올의 부피를 선택한다.

1.3.1.4 일반적으로 $\log P_{ow}$ 값이 4.5 이상인 화합물을 1 L 용기를 사용하여 측정할 경우 n-옥탄올 20 mL ~ 50 mL에 물 950 mL ~ 980 mL 비율로 시험을 수행한다.

1.3.1.5 시험온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지해야 한다.

1.3.1.6 시험장치가 햇빛에 노출되지 않도록 암실에서 시험을 수행하거나 알루미늄 호일로 시험용기를 감싼다.

1.3.1.7 시험은 가능하면 먼지가 없는 환경에서 수행한다.

1.3.2 측정조건

1.3.2.1 분석 방법

적절한 분석법을 이용하여 시험물질을 분석한다. 시험물질에 대한 선택한 분석법의 정량한계가 설정되어야 한다. 정량한계는 신호대잡음비(Signal/Noise ratio)가 10 인 수층 및 n-옥탄올층의 농도로 한다. 수포화 n-옥탄올과 n-옥탄올 포화수에서 시험물질의 농도가 정량한계 이상임을 입증하여야 한다.

1.3.2.3 log P_{ow} 값 추정

여러 가지 프로그램이나 전문가의 판단을 통해 log P_{ow} 예상 값을 산출할 수 있다. 시판되는 log P_{ow} 값 산정 소프트웨어 프로그램^(주4)이 많다(예 : Clog $P^{(주5)}$, KOWWIN^(주6), ProLogP^(주7) 및 ACD log $P^{(주8)}$ 등).

log P_{ow} 값 추정 방법에 대한 자세한 내용은 주 9 ~ 주 11를 참고한다.

1.3.2.4 평형 시간 결정

n-옥탄올/물 혼합액이 평형에 도달할 때까지 교반한다. 평형에 도달하는데 소요되는 시간을 산정하기 위해 완속 교반을 하면서 수층과 옥탄올층에서 주기적으로(최소 5 시간 주기로) 시료를 채취하여 측정하는 예비시험을 수행한다. n-옥탄올/물 농도비 대비 시간 (4 개 지점)의 회귀식이 유의수준 0.05에서 기울기가 거의 "0"인 경우 평형에 도달한 것으로 본다. 최소 평형 시간은 시료를 채취하기 하루 전이다. 일반적으로 log P_{ow} 측정값이 5 미만인 물질의 경우 2 일 ~ 3 일 동안 채취하며 시험물질이 소수성일수록 평형에 도달하는 시간이 길어진다. 단일 용기에서 반복적으로 시료를 채취하여 평형 시간을 결정한다.

1.3.2.5 추출 및 예비 농축/희석

소수성 시험물질의 경우 수층에서의 농도가 낮으므로 분석 전에 수층에서 채취한 시료를 유기용매로 추출하고 추출물을 예비 농축하는 과정이 필요하다. 이와

동일한 이유로 최종 공시험 액의 농도를 줄일 필요가 있다. 따라서 고순도 용매를 사용한다. 시험 전에 유리용기를 용매로 세척하거나 고온에서 굽는 등의 방식으로 세척함으로써 상호 오염을 막을 수 있다.

$\log P_{ow}$ 예상 값이 6 보다 큰 시험물질은 바탕실험을 통해 바탕 값을 보정해야 하며 분석물이 다른 시료로 이월(carry-over)되지 않도록 주의해야 한다. 또한 수층 시료를 추출하고 농축하는 동안 손실이 발생할 수 있으므로 회수율 보정용 대체 표준물질(surrogate standard)을 사용한다. 정확한 회수율 보정을 위해서는 시험물질과 유사하거나 동일한 특성을 지닌 대체 표준물질을 사용한다. 시험물질을 동위원소(예 : 과중수소 또는 ^{13}C)로 표지하거나 하는데 동위원소 표지가 불가능한 경우 시험물질과 물리 화학적 특성이 유사한 대체 표준물질을 사용한다. 수층을 액-액 추출하는 과정에서 에멀전이 생길 수 있는데 이때 소금을 첨가하고 하룻밤 동안 방치하면 이러한 현상을 줄일 수 있다.

필요한 경우 n-옥탄올층에서 추출한 시료를 적절한 용매로 희석하여 분석한다. 회수율 실험에서 편차가 큰 경우(상대표준편차 > 10 %) 대체 표준물질을 사용하여 회수율 보정을 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

일정한 온도에서 시험계에 사용된 모든 요소(물, 옥탄올, 시험물질) 사이에 평형이 이루어지면 두 층에 녹아있는 시험물질의 농도를 측정하여 분배계수를 결정한다. $\log P_{ow}$ 예측 값이 5 이상인 소수성 화학물질의 분배계수는 완속교반법으로 측정한다. 플라스크 진동법(제1항 분배계수시험)은 수층에 존재하는 옥탄올 방울에서 미세방울이 생성되어 수층의 시험물질 농도가 과다 측정되는 결과를 초래하므로 P_{ow} 값이 4 미만인 시험물질에 한하여 적용하여야 한다. 완속교반법을 사용할 경우 n-옥탄올 미세방울 생성을 줄일 수 있고 교반으로 인해 두 층 사이의 교환이 가속화된다.

완속교반법으로 n-옥탄올/물 분배계수를 측정하기 위해서는 시험물질에 관한

다음과 같은 정보를 확보하여야 한다.

- (1) 구조식
- (2) 물 및 n-옥탄올에서 시험물질의 농도 측정에 적합한 분석법
- (3) 이온화할 수 있는 물질의 경우
- (4) 물용해도
- (5) 비생물적 가수분해
- (6) 생물학적 분해성
- (7) 증기압

2.2 시험절차

2.2.1 시험용기를 n-옥탄올 포화수로 채우고 설정한 시험온도에 도달할 때까지 충분한 시간동안 방치한다.

2.2.2 시험용기에 설정한 양의 시험용액(수포화 n-옥탄올에 용해시킨 시험물질 용액)을 가한다. 이때 두 상의 난류 혼합이 발생하지 않도록 주의해야 한다. 피펫으로 수표면에 가까운 시험용기 벽면을 따라 n-옥탄올을 가하면 n-옥탄올이 유리 벽면을 따라 흘러 수층 위에 막을 형성한다. 시험용기에 직접 n-옥탄올을 가해서는 안 되며 n-옥탄올 방울이 수층에 직접 떨어지지 않도록 해야 한다.

2.2.3 교반을 시작하고 서서히 교반속도를 높인다. 교반 모터의 조절이 불가능하면 변압기를 사용한다. 수층과 n-옥탄올층 경계에서 0.5 cm ~ 2.5 cm 깊이에서 와류가 일어나도록 교반 속도를 조절한다. 와류의 깊이가 2.5 cm를 초과하면 교반 속도를 줄여야 한다. 그렇지 않으면 수층에 존재하는 작은 n-옥탄올 방울에서 미세 방울이 생성되어 수층에 존재하는 시험물질의 농도가 과대평가될 수 있다. 링 시험 유효성 연구(ring test validation study) 결과에 따르면 n-옥탄올 미세방울의 생성을 저해하면서 빠른 속도로 평형에 도달하도록 하기 위해서는 최대 와류 깊이를 2.5 cm로 조절하는 것이 적절하다(주 13).

2.2.4 시료 채취 및 처리

시료를 채취하기 전에 교반을 중지하여 액체의 움직임이 정지되도록 한다. 시료 채취 후에는 다시 위에서 설명한 방식으로 서서히 교반 속도를 높인다.

2.2.4.1 수층 시료의 채취

수층은 반응 용기 바닥에 있는 잠금 꼭지에서 시료를 채취한다. 잠금 꼭지 내의 물은 교반되지 않아 평형상태가 아니므로 일정량(<그림>에 주어진 용기의 경우 약 5 mL) 버리고 시료를 채취한다. 채취한 수층 시료의 양을 기록한다. 질량수지(Mass balance)를 설정할 때는 버려지는 수층에 함유된 시험물질의 양을 고려해야 한다. 수층은 분별 깔대기를 통해 천천히 흘려보냄으로써 증발을 최소화하고 수층과 n-옥탄올층에 교란이 일어나지 않도록 한다.

2.2.4.2 n-옥탄올층 시료의 채취

100 μ L 유리금속 주사기를 사용하여 n-옥탄올층에서 소량(약 100 μ L)을 분취하여 n-옥탄올층 시료로 한다. n-옥탄올층 시료는 희석하여 분석하므로 소량의 시료로도 충분하다. 시료 채취 시 경계층이 교란되지 않도록 주의하며 채취한 시료의 양을 기록한다.

2.3 시험상의 유의사항

2.3.1 불순물이 존재할 경우 시험물질의 활동계수에 영향을 줄 수 있으므로 시판되는 고순도의 시험물질을 사용한다.

2.3.2 본 시험법은 해리하거나 결합하지 않으며 계면활성이 크지 않은 순수한 물질 및 그 혼합물의 n-옥탄올/물 분배계수 측정에 적용할 수 있다. 혼합물의 경우 측정된 n-옥탄올/물 분배계수는 혼합물의 화학적 조성 및 수층에서의 전해질 조성에 따라 달라질 수 있다.

2.3.3 유기산, 페놀, 유기염기 및 유기금속과 같이 해리성 물질은 물과 n-옥탄올에서 다중 평형을 이루므로 이들 물질의 n-옥탄올/물 분배계수는 전해진 조성에 따라 달라진다(주 12, 13). 따라서 시험 중에 pH와 전해질 조성을 조절해야 하며 이를 기록해 두어야 한다. 측정된 분배비율은 전문가의 판단에 따라 평가한다.

해리상수 값을 이용하여 적절한 pH 값을 선택하고 각각의 이온화 상태에서의 분배계수를 측정한다. 유기금속 화합물을 시험할 경우에는 비착화(Non-complexing) 완충용액을 사용해야 한다(주 13). 현존하는 수용액 화학(착물화상수, 해리 상수)에 관한 지식을 고려하여 대한 기준 정보를 고려하여 수층에서 시험물질의 화학종이 규명되도록 시험조건을 선택한다. 바탕 전해질(Background electrolyte)을 사용하여 모든 시험에서 이온 강도가 동일하도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

최소 3 개의 독립된 완속 교반 시험을 수행하고 각각 P_{ow} 값을 측정한다.

1.1 평형 달성에 대한 설명

각각의 시료를 채취 할 때마다, n-옥탄올/수층의 시험물질 농도비를 로그값으로 환산하여($\log C_o/C_w$) $\log C_o/C_w$ vs 시간 그래프를 만들어, 화학 평형 도달 여부를 확인한다. 최소 4 개의 연속 지점에서 유의수준 0.05에서 기울기가 “0”에 도달하면 시험물질이 n-옥탄올에 완전히 용해되어 평형에 도달하였음을 의미한다.

1.2 $\log P_{ow}$ 값 계산

$\log C_o/C_w$ vs 시간 그래프 가운데 평형에 도달한 영역에서 분산치의 역을 가중하여 $\log C_o/C_w$ 의 가중 평균값을 구한다.

1.3 $\log P_{ow}$ 평균값 계산

$\log P_{ow}$ 평균값은 개별 실험 단위에서 각각의 분산치로 가중된 결과의 평균값으로 한다. 계산 방식은 아래와 같다.

$$\log P_{ow,AV} = \left(\sum w_i \times \log P_{ow,i} \right) \times \left(\sum w_i \right)^{-1}$$

여기에서, $\log P_{ow,i}$ = 각 실험 장치 i 의 $\log P_{ow}$ 값

$\log P_{ow,AV}$ = 각 $\log P_{ow}$ 값의 가중 평균

$w_i = \text{var}((\log P_{ow,i})^{-1})$, $\log P_{ow,i}$ 의 가변도의 역

1.4 $\log P_{ow}$ 평균값에 대한 오차는 각 실험 단위에서 평형 구간에서 측정한 $\log C_o/C_w$ 값의 재현성으로 볼 수 있다. 이는 $\log P_{ow,AV}$ 가중표준편차($\sigma_{\log P_{ow,AV}}$)로 표현되며 $\log P_{ow,AV}$ 값과 관련된 오차 값이다. 가중가변도($\text{var}_{\log P_{ow,AV}}$)로부터 가중표준편차를 구하는 식은 다음과 같다.

$$\text{var}_{\log P_{ow,AV}} = \left(\sum w_i \times (\log P_{ow,i} - \log P_{ow,AV})^2 \right) \times \left(\sum w_i \times (n-1) \right)^{-1}$$

$$\sigma_{\log P_{ow,AV}} = (\text{var}_{\log P_{ow,AV}})^{0.5}$$

여기에서, n = 실험 단위의 수

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 : (1) 일반명, 화학명, CAS 번호, 구조식(방사성 동위원소 표지 물질을 사용할 경우 표지 위치 표시) 및 물리화학적 성질

(2) 시험물질의 순도

(3) 표지 물질을 사용할 경우 표지 순도 및 몰 활성도

(4) $\log P_{ow}$ 의 일차 추정 값 및 추정방법

2.5 시험조건 : (1) 시험수행 날짜

(2) 시험온도

(3) 시험 개시 시 n-옥탄올층과 수층의 부피

(4) n-옥탄올층과 수층에서 채취한 시료의 부피

- (5) 시험용기에 남아있는 n-옥탄올층과 수층의 부피
- (6) 시험용기 및 교반조건에 대한 설명(교반 막대의 기하학적 구조, 와류 깊이(mm), 교반 속도)
- (7) 분석방법 및 검출한계, 정량한계
- (8) 추출방법 및 예비농축/희석인자
- (9) 시료 채취 횟수
- (10) 수층의 pH 및 사용된 완충용액
- (11) 반복횟수

2.6 시험결과 : (1) 분석방법의 재현성 및 감도

- (2) n-옥탄올층 및 수층에서 시간별 시험물질 농도
- (3) 질량균형(Mass balance)에 대한 입증
- (4) 시험 중의 온도 및 그 표준편차
- (5) 시간 대비 농도의 회귀식
- (6) $\log P_{ow}$ 평균값 및 표준오차
- (7) 결과에 대한 논의 및 해석
- (8) 대표적인 분석용 기초 자료 계산 예시(모든 기초 자료는 GLP규정에 따라 보관되어야 함). 여기에는 대표 대체물질의 회수, 보정에 사용된 level수(보정곡선의 상관계수 기준과 함께) 및 QA/QC 결과를 포함해야 함
- (9) 가능한 경우 분석 절차에 대한 검증 보고서(참고문헌 표기)

- 주1) Boethling R.S., Mackay D. (eds.) (2000). Handbook of property estimation methods for chemicals. Lewis Publishers Boca Raton, FL, USA.
- 주2) Pinsuwan, S., Li, A. and Yalkowsky, S.H. (1995). Correlation of octanol/water solubility ratios and partition coefficients, J. Chem. Eng. Data., 40: 623-626.
- 주3) De Bruijn JHM, Busser F, Seinen W, Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients with the 'slow-stirring' method. Environ. Toxicol. Chem. 8: 499-512.
- 주4) 본 정보는 사용자 편의를 위해서만 제공된다. 동일한 결과를 얻을 수 있다는 것이 입증된다면, 기타 상응하는 컴퓨터 프로그램을 사용한다.
- 주5) Leo A, Weininger D. (1989). Medchem Software Manual. Daylight Chemical Information Systems, Irvine, CA.
- 주6) Meylan W. (1993). SRC-LOGKOW for Windows. SRC, Syracuse, N.Y.
- 주7) Compudrug L. (1992). ProLogP. Compudrug, Ltd, Budapest.
- 주8) ACD. ACD logP; Advanced Chemistry Development: Toronto, Ontario M5H 3V9, Canada, 2001.
- 주9) Lyman WJ. (1990). Octanol/water partition coefficient. In Lyman WJ, Reehl WF, Rosenblatt DH, eds, Handbook of chemical property estimation, American Chemical Society, Washington, D.C.
- 주10) Rekker RF, de Kort HM. (1979). The hydrophobic fragmental constant: An extension to a 1000 data point set. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther. 14: 479-488.
- 주11) Jübermann O. (1958). Houben-Weyl, ed, Methoden der Organischen Chemie, 386-390.
- 주12) Schwarzenbach RP, Gschwend PM, Imboden DM. (1993). Environmental Organic Chemistry. Wiley, New York, NY.
- 주13) Arnold CG, Widenhaupt A, David MM, Müller SR, Haderlein SB, Schwarzenbach RP. (1997). Aqueous speciation and 1-octanol-water partitioning of tributyl- and triphenyltin: effect of pH and ion composition. Environ. Sci. Technol. 31: 2596-2602.

<부록>

수용액 다양한 $\log P_{ow}$ 값을 갖는 물질의 검출에 필요한 최소 물 부피 산정표

1. 가정:

1.1 개별 시료 최대 부피 = 전체 부피의 10 %

1.2 시험 물질 농도 = $0.7 \times$ 각 상에서의 용해도 (저농도인 경우 더 많은 부피 필요)

1.3 검출 한계 산정에 사용되는 부피 = 100 mL

1.4 $\log P_{ow}$ vs $\log S_w$ 및 $\log P_{ow}$ vs SR (S_{oct}/S_w)는 시험 물질의 상관성 제시에 유용

S_w 추정			
$\log P_{ow}$	계산식	$\log S_w$	$S_w(\text{mg/L})$
4	$(-0.922 \times \log P_{ow} + 4.184)$	0.496	3.133E + 00
4.5		0.035	1.084E + 00
5		-0.426	3.750E - 01
5.5		-0.887	1.297E - 01
6		-1.348	4.487E - 02
6.5		-1.809	1.552E - 03
7		-2.270	5.370E - 03
7.5		-2.731	1.858E - 0.
8		-3.192	6.427E - 04

S_{oct} 추정		
$\log P_{ow}$	계산식	$S_{oct}(\text{mg/L})$
4	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.41$	3.763E + 04
4.5	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.42$	4.816E + 04
5	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.43$	6.165E + 04
5.5	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.44$	7.890E + 04
6	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.45$	1.010E + 05
6.5	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.46$	1.293E + 05
7	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.47$	1.654E + 05
7.5	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.48$	2.117E + 05
8	$\log P_{ow} = 0.88 \log SR + 0.49$	2.710E + 05

시험물질 총질량 (mg)	Mass _{Oct} /Mass _{water}	Mass _{H2O} (mg)	Conc _{H2O} (mg/L)	Mass _{Oct} (mg)	Conc _{Oct} (mg/L)
1319	526	2.5017	2.6333	1.317	26.333
1686	1664	1.0027	1.0660	1.685	33.709
2158	5263	0.4099	0.4315	2.157	43.149
2762	16644	0.1659	0.1747	2.762	55.230
3535	52632	0.0672	0.0707	3.535	70.691
4524	166436	0.0272	0.0286	4.524	90.480
5790	526316	0.0110	0.0116	5.790	115.807
7411	1664357	0.0045	0.0047	7.411	148.223
9486	5263158	0.0018	0.0019	9.486	189.713

부피계산

각 검출한계 농도에서 수층에 필요한 최소 부피

log K _{ow}	LOD (μg/L)→	0.001	0.01	0.10	1.00	10
4		0.04	0.38	3.80	38	380
4.5		0.09	0.94	9.38	94	938
5		0.23	2.32	23.18	232	2318
5.5		0.57	5.73	57.26	573	5726
6		1.41	14.15	141	1415	14146
6.5		3.50	34.95	350	3495	34950
7		8.64	86.35	864	8635	86351
7.5		21.33	213	2113	21335	213346
8		52.71	527	5271	52711	527111
LOD 검출에 필요한 부피 (L)	0.1					

수층 총 부피의 10 % 미만을 표시(1 L 평형용기)
수층 총 부피의 10 % 미만을 표시(2 L 평형용기)
수층 총 부피의 10 % 미만을 표시(5 L 평형용기)
수층 총 부피의 10 % 미만을 표시(10 L 평형용기)
10 L 평형용기의 10 % 초과

물용해도 및 Log P_{ow}별 산정 부피 개요

각 검출한계 농도에서 수층에 필요한 최소 부피 (mL)

log P _{ow}	S _w (mg/L)	LOD (μg/L)→	0.001	0.01	0.10	1.00	10
4	10		0.01	0.12	1.19	11.90	118.99
	5		0.02	0.24	2.38	23.80	237.97
	3		0.04	0.40	3.97	39.66	396.62
	1		0.12	1.19	11.90	118.99	1189.86
4.5	5		0.02	0.20	2.03	20.34	203.37
	2		0.05	0.51	5.08	50.84	508.42
	1		0.10	1.02	10.17	101.68	1016.83
	0.5		0.20	2.03	20.34	203.37	2033.67
5	1		0.09	0.87	8.69	86.90	869.01
	0.5		0.17	1.74	17.38	173.80	1738.02
	0.375		0.23	2.32	23.18	231.75	2317.53
	0.2		0.43	4.35	43.45	434.51	4345.05
5.5	0.4		0.19	1.86	18.57	185.68	1856.79
	0.2		0.37	3.71	37.14	371.36	3713.59
	0.1		0.74	7.43	74.27	742.72	7427.17
	0.05		1.49	14.85	148.54	1485.43	14854.35
6	0.1		0.63	6.35	63.48	634.80	6347.95
	0.05		1.27	12.70	126.96	1269.59	12695.91
	0.025		2.54	25.39	253.92	2539.18	25391.82
	0.0125		5.08	50.78	507.84	5078.36	50783.64
6.5	0.025		2.17	21.70	217.02	2170.25	21702.46
	0.0125		4.34	43.40	434.05	4340.49	43404.93
	0.006		9.04	90.43	904.27	9042.69	90426.93
	0.003		18.09	180.85	1808.54	18085.39	180853.86
7	0.006		7.73	77.29	772.89	7728.85	77288.50
	0.003		15.46	154.58	1545.77	15457.70	154577.01
	0.0015		23.19	231.87	2318.66	23186.55	231865.51
	0.001		46.37	463.73	4637.31	46373.10	463731.03
7.5	0.002		19.82	198.18	1981.77	19817.73	198177.33
	0.001		39.64	396.35	3963.55	39635.47	396354.66
	0.0005		79.27	792.71	7927.09	79270.93	792709.32
	0.00025		158.54	1585.42	15854.19	158541.86	1585418.63
8	0.001		33.88	338.77	3387.68	33876.77	338767.72
	0.0005		67.75	677.54	6775.35	67753.54	677535.44
	0.00025		135.51	1355.07	13550.71	135507.09	1355070.89
	0.000125		271.01	2710.14	27101.42	271014.18	2710141.77
LOD 검출에 필요한 부피 (L) 0.1							

제14항 인화점시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 발화원으로 증기를 점화시킬 수 있는 액체물질의 인화점을 알아보기 위함이다.

2. 정의 및 단위

2.1 인화점

101.325 kPa의 압력과 개별시험법에서 기술하고 있는 조건 하에서 시험용기 중 인화성 증기 또는 기체 혼합물이 액체로부터 기체로 되는 최저온도

2.2 인화점 단위

인화점의 단위로 °C를 이용하며, 다음의 식을 이용하여 구한다.

$$T_0 = T - 273.15$$

여기에서, T_0 = 인화점 섭씨온도(°C)

T = 인화점 절대온도(K)

또한, 다음 식을 이용하여 101.3 kPa의 표준 대기압으로 보정된 인화점 T_c 를 구한다.

$$T_c = T_0 + 0.25(101.3-p)$$

여기에서, T_c : 표준 대기압(101.3 kPa)에서의 인화점 (°C)

T_0 : 주변 대기압에서의 인화점 (°C)

p : 주변 대기압 (kPa)

(※ 주의 ; 이 계산식은 98.0 kPa ~ 104.7 kPa의 압력 범위 내에서만 정확히 보정된다)

II. 시험

1. 시험의 준비

각 개별시험법(평형법 또는 비평형법)에서 사용되는 시험장치를 이용하여 시험물질을 넣는다. 안전을 위하여 독성물질 또는 고에너지물질의 경우 소량(약 2 cm³ 정도)만을 사용하도록 한다. 가능한 한 시험장치는 통풍이 되지 않으며 평평하고 흔들림이 없는 안전한 곳에 설치하여야 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 시험용기에 넣고 개별시험법에서 요구하는 시험온도까지 냉각 또는 가열한다. 다음으로 시험온도에서 시험물질에 불이 붙는지를 알아보기 위하여 점화를 시도한다.

2.2 평형법

ISO 1516 (-30 °C ~ 80 °C), ISO 3680 (-30 °C ~ 300 °C), ISO 1523 (-30 °C ~ 110 °C), ISO 3679 (-30 °C ~ 300 °C) 및 KS M ISO 1523_2008 (-30 °C ~ 110 °C)을 참조한다.

2.3 비평형법

2.3.1 Abel 기구

BS 2000 part 170, French Standard NF M07-011, French Standard NF T66-009 및 KS M ISO 13736_2003 (-30 °C ~ 70 °C)을 참조한다.

2.3.2 Abel-Pensky 기구

EN 57, DIN 51755 part 1 (5 °C ~ 65 °C), DIN 51755 part 2 (-30 °C ~ 5 °C), French Standard NF M07-036을 참조한다.

2.3.3 Tag 기구

ASTM D 56, KS M2010 (93 °C 이하)을 참조한다.

2.3.4 Pensky-Martens 기구

ISO 2719 (40 °C 이상), EN 11, DIN 51758(-30 °C ~ 65 °C), ASTM D 93, BS 2000-34, French Standard NF M07-019 및 KS M ISO 2719_2003(40 °C 이상)을 참조한다.

※ 주의사항:

- (1) 2.3의 비평형법을 이용하여 얻어진 인화점이 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, $55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이라면 동일한 기구를 이용한 평형법으로 시험할 수도 있다.
- (2) 통지용으로 사용할 때에는 한 가지 시험방법 만을 사용한다.
- (3) 용매에 든 점성물질(페인트, 점착제 및 유사물질)의 인화점을 확인하는 경우, 아래의 시험법 중 한가지의 기구와 시험법을 이용한다.
(ISO 3679, ISO 3680, ISO 1523, DIN 53213 part 1을 참조한다.)

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

1.1 시험기관의 명칭 및 소재지

1.2 시험책임자 및 담당자 성명

1.3 시험 일자 및 조건

- (1) 시험수행일자
- (2) 시험일자의 온도, 습도 및 대기압력

1.4 시험물질

- (1) 정확한 물질 규격 (식별 정보와 불순물 정보)
- (2) 입수처, 입수일

1.5 사용한 방법의 방법편차

1.6 시험결과

- (1) 측정 결과 (인화점)
- (2) 기타 시험과정에서 관찰되었거나 결과해석과 관련 있는 특기사항

제15항 인화성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 물질의 가연성에 대한 정보와 폭발성에 대한 예비 정보를 수집하는 데 있다. 이 시험방법은 분말, 입자, 반죽형 물질에만 적용할 수 있다. 매우 빠르게 연소되거나 연소가 특별히 위험하게 일어나는 물질을 단순히 점화가 될 수 있는 물질들과 구분하기 위해 연소 속도가 특정 한계치를 넘는 물질들은 인화도가 높은 것으로 간주하여 인화성 물질로 분류한다. 고온발광이 금속 분말로 유전되는 경우 화재를 진화하기 어렵기 때문에 특히 위험할 수 있다. 지정한 시간 안에 물질 전체가 고온발광 된다면 금속 분말의 인화성이 높은 것으로 간주된다.

2. 정의 및 단위

연소시간은 시간, 분, 초단위로 표시하되 최소단위를 초로 한다.

II. 시험

1. 시험방법

1.1 원리

시험물질을 중간이 끊어지지 않은 띠 형태 또는 250 mm 길이의 분말 트레인으로 만들어 기체 불꽃으로 인화시킨 후 특정한 두 지점 사이에서 연소가 트레인을 따라 진행하는 시간을 측정함으로써 연소속도를 결정한다. 본 실험에 앞서 예비시험을 수행함으로써 불꽃이나 연기가 생기는지를 알아본다. 또한 예비실험에서 지정한 시간에 트레인이 200 mm 이상 유전되면 연소속도를 결정하는 본 시험을 실시한다.

1.2 예비 시험

비가연성이고 공극이 없으며 열전도율이 낮은 판위에 시험물질을 중간이 끊어지지 않은 띠 모양이나 길이 250 mm, 폭 20 mm, 높이 10 mm의 분말 트레인으

로 만든다. 가스버너(최소 직경 5 mm)를 이용하여 분말이 점화되거나 또는 최대 2 분간(금속 분말 또는 금속합금의 경우는 5 분) 분말 트레이의 한쪽에 고온 불꽃(최소온도 1,000 ℃, 주)를 낸다. 만일 시험물질이 4 분(금속 분말은 40 분) 이내에 점화되고 200 mm 이상의 길이가 연소되거나 연기를 내며 타 들어가지 않으면 인화성이 높지 않은 것으로 간주하고 더 이상 시험을 수행하지 않아도 되지만 주어진 시간(4 분 또는 금속분말의 경우 40 분) 내에 200 mm 이상이 연소 되면 본 실험을 수행한다.

1.3 본 시험

1.3.1 시험의 준비

분말이나 과립형 물질을 (<그림>)에 도시된 길이 250 mm, 내부에 높이 10 mm, 외부폭 20 mm의 단면 삼각형 형태의 주형에 헐겁게 채워넣는다. 주형의 상판 덮개를 덮은 후 주형을 2 cm 높이에서 단단한 표면으로 세 번 떨어뜨린다. 주형의 상판덮개를 제거한 후 비가연성이고 공극이 없으며 열전도율이 낮은 기판을 주형의 상단에 놓고 기구를 뒤집은 후 주형은 제거한다.

반죽형 물질은 비연소성의 공극이 없으며 열전도율이 낮은 기판위에 약 1 cm² 단면적을 가진 길이 250 mm의 로프 형태로 만들어 놓는다.

1.3.2 시험

흡후드내에 시료를 준비한다. 연기가 실험실내로 유입되지 않도록 흡후드의 공기 속도를 충분히 조절하고 시험 중에는 일정하게 유지되도록 한다. 장치 주변에 통풍 차폐막을 설치한다.

작은 불꽃이나 최소 1,000 ℃의 뜨거운 열선을 이용하여 시료의 한쪽 끝에 점화한다. 시료가 80 mm 정도까지 연소하면, 그때부터 100 mm 길이가 연소될 때까지의 연소율을 측정한다. 매번 차갑고 깨끗한 판을 이용하여 시험을 6 회 반복하되 양성결과 (연소속도가 최대한계를 초과)를 얻으면 시험을 중단하여도 된다.

1.4 시험상의 유의사항

습기에 민감한 물질이라면, 용기에서 꺼낸 직후에 가급적 빨리 시험을 해야 한다.

1.5 시험결과

- 예비 시험에서 얻은 연소 시간
- 6 회 반복의 본 시험을 통해 얻은 가장 짧은 연소 시간

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 계산

본 시험 절차에 따라 수행한 분말, 과립형, 반죽형 물질의 경우 100 mm 길이만큼 전달되는 연소 시간이 45 초 이내인 경우 높은 인화성물질로 간주한다.

금속이나 금속 합금 분말의 경우에는 10 분 안에 인화되어 불꽃이 생기고 연소 불꽃이 전체 시료로 퍼져나가면 높은 인화성물질로 간주한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험일자 및 조건

(1) 시험수행일자

(2) 시험일자의 온도, 습도 및 대기압력

2.4 시험물질

(1) 일반명, 화학명, CAS 번호, 구조식 및 관련 물리화학적 성질

(2) 시험 물질 순도, 불순물 함량

(3) 시험 물질의 특성 및 수분함량 등 물리적 상태

2.5 시험조건

(1) 사용한 시험 시스템

(2) 시험물질 처리 : 반복 수, 시험물질 처리 방법 등

(3) 시험기간 중 시험계획서 또는 시험조건의 이탈 내용

2.6 시험결과

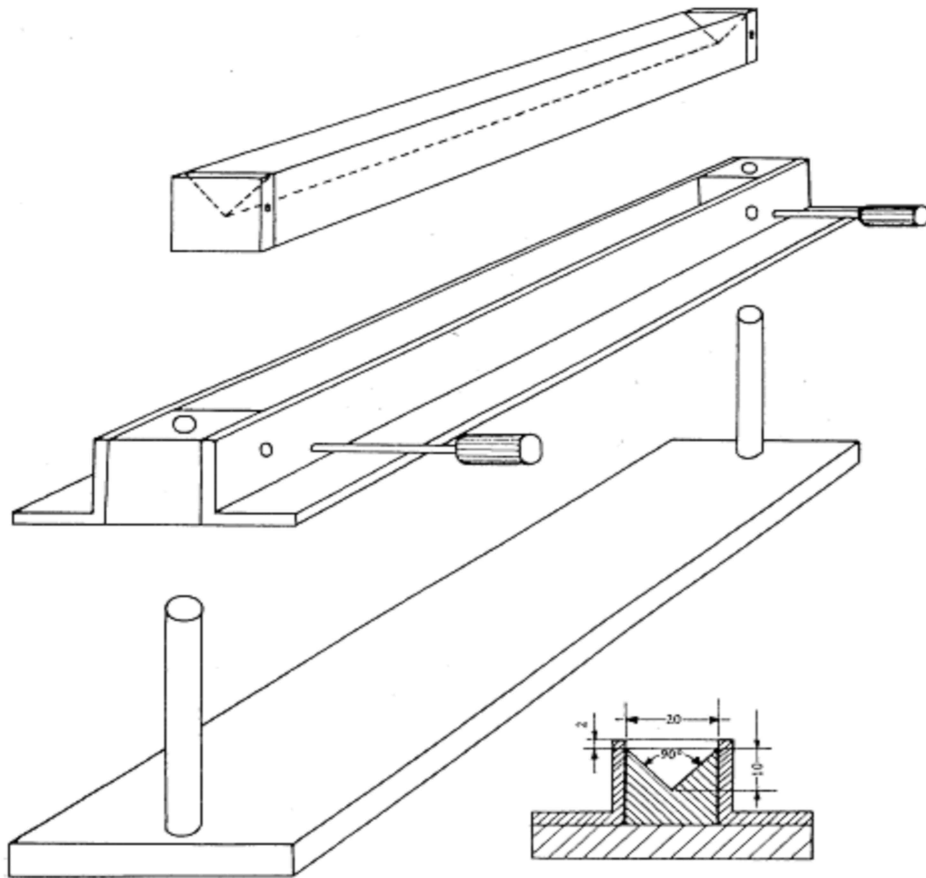
(1) 예비 시험 및 본 시험 측정값(모든 측정값은 GLP 자료보관실에 보관되어야 함)

(2) 결과 해석

(3) 결과와 관련된 특기사항 논의

주) United Nations (ed). (2008). Manual of Tests and Criteria, Part III : Classification Procedures, Test Methods and Criteria relating to Class 3, Class 4, Division 5.1 and Class 9.

별 첨



주형길이 : 250 mm
소재 : 알루미늄

<그림> 시료준비에 필요한 주형과 부속품 그림(모든 치수는 밀리미터 단위임)

제16항 폭발성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 불꽃(열감도)이나 충격, 마찰(기계적 자극 감도)로 고체나 반죽형 물질이 폭발 위험이 있는지, 액상 물질에 충격이나 화염이 가해질 때 폭발 위험이 있는지 알아보기 위함이다.

이 방법은 다음 세 부분으로 되어 있다.

- (a) 열감도 시험
- (b) 충격에 대한 기계적 감도 시험
- (c) 마찰에 대한 기계적 감도 시험

이 방법은 통상의 자극으로 폭발이 시작될 수 있는지에 대한 데이터를 제공해주며, 물질이 모든 조건에서 폭발하는지를 알아보는 시험은 아니다. 이 방법은 물질이 지침 상의 특정 조건에서 폭발위험(열감도 및 기계적 감도)이 있는지 알아보는 데 적합하며 국제적으로 많이 사용되며 의미 있는 결과를 제공하는 여러 형태의 기구를 기준으로 하였으나 이 방법이 결정적인 것은 아니다. 국제적으로 인지되고 있으며 특정 지정된 기구와 적절히 상관성이 제시될 수 있는 결과를 제공할 수 있으면 다른 기구를 사용할 수도 있다.

물질의 화학적 구조에 있어서 반응성이 큰 작용기가 없고 열역학적 정보(형성열 또는 분해열)가 잘 알려져 있어서 확실히 기체나 열을 발생시키면서 빠르게 분해될 가능성이 전혀 없을 것으로 예상되는 물질의 경우(즉, 물질의 폭발위험성이 전혀 없을 것으로 추정되는 경우)에는 이 시험을 수행하지 않아도 된다.

2. 정의

2.1 폭발물질

특정 기구에서 불꽃의 영향을 받거나, 충격에 민감하거나 또는 마찰의 영향으로 물질이 터지는 물질. (혹은 다른 기구에서 1,3-디니트로벤젠보다 기계적으로 민감한 물질)

2.2 대조물질

충격 및 마찰 시험법을 수행할 때는 0.5 mm 체를 통과하는 결정형 1,3-디니트로벤젠을 대조물질로 사용한다. 두 번째 충격 및 마찰 시험을 수행할 때는 대조물질로서 퍼히드록-1,3,5-트리니트로-1,3,5-트리아진(RDX, hexogen, cyclonite, CAS 121-82-4)을 액상 시클로헥사논에서 재결정화 하고 250 μm 체에 습식통과 시킨 후 150 μm 체에 걸린 고체를 $103\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (4 시간)에서 건조한다.

II. 시험

1. 시험방법

1.1 원리

세 가지 감도 시험에 안전한 조건을 구축하려면 예비시험이 필요하다.

1.1.1 취급안전 시험

안전상의 이유로 본 시험에 들어가기 전에 아주소량의 시료(약 10 mg)를 가스 불꽃 없이 가열하여, 편리한 기구를 사용하여 충격을 가하거나, 모루에 대고 망치로 마찰을 주거나 마찰기계를 사용하여 마찰을 준다. 이렇게 하는 것은 특히 열감도 시험의 경우 물질이 폭발하여 시험자가 상해를 입는 일이 없도록 주의하기 위해서이다.

1.1.2 열감도

구멍의 직경이 다른 오리피스로 막은 강철 튜브에 물질을 넣어둔 상태에서 강한 열에서 물질이 폭발하는지 알아본다.

1.1.3 기계적 감도 (충격)

특정 높이에서 떨어뜨렸을 때 특정 물질에 충격을 준 상태에서 폭발하는지 알아본다.

1.1.4 기계적 감도 (마찰)

특정 조건에서 일정한 하중과 관련 작동으로 고체나 반죽형 물질을 표준 표면 사이에서 마찰시킬 때 폭발하는지 알아본다.

1.2 방법

1.2.1 열감도 (불꽃의 영향)

1.2.1.1 기구

재사용 가능한 밀폐 장치가 장착된 일회용 강철 튜브(그림 1)를 가열 및 보호 장치에 장착한다. 각 튜브는 철판으로 형을 갖춘 것이어야 하며(부록) 내경은 24 mm, 길이 75 mm, 벽두께 0.5 mm로 한다. 튜브의 개구부는 플랜지로 이음매 되어 오리피스판을 조립해 닫을 수 있게 한다. 이 부분은 중앙에 구멍이 있고 장전콜러(threaded collar)와 너트로 된 스크류 조인트로 조일 수 있는 내압 오리피스 판으로 되어 있다. 너트와 장전콜러 부분은 크롬-망간 강으로 되어(부록) 800 °C에서도 불꽃이 일지 않는 것으로 한다. 오리피스 판은 두께 6 mm, 내열 성 강으로(부록) 개구부 직경에 사용할 수 있는 것으로 한다.

1.2.1.2 시험조건

일반적으로 물질은 받은 상태로 시험하지만, 경우에 따라(프레스, 캐스트, 압착된 경우) 분쇄한 후 시험을 해야 할 수도 있다. 고체인 경우, 2 단계 건식 절차로 각 시험에 사용하는 물질의 질량을 잰다. 질량을 측정한 튜브에 물질을 9 cm³ 채우고 튜브 단면을 80 N의 힘으로 막는다. 안전상 이유 및 건식의 물리적 형태로 인해 압력을 주었을 때 변형이 우려된다면 다른 방법으로 채워 넣어도 된다(예, 물질이 마찰에 매우 민감하다면 다져 넣는 방식은 적합하지 않다). 물질을 압착하는 것이 가능하다면 내용물을 더 채워 넣고 튜브 상부에서 55 mm까지 찰 때 까지 눌러 넣는다. 55 mm까지 채워 넣은 물질의 양을 조사하고 80 N의 힘으로 두 번 더 채워 넣는다. 그런 후 눌러서 물질을 채우거나 필요 시 상부에서 15 mm만 남기고 덜어낸다. 처음 양의 1/3부터 시작하여 두 번째 건식 시험을 시작한다. 80 N의 힘으로 튜브 상단에서 15 mm 높이까지 물질을 두 번 더 채워 넣는다. 필요하다면 더 채워 넣거나 덜어낸다. 두 번째 건식 시험에서 알아본 고체의 양을 각 시험에 사용한다. 채워 넣는 양은 세 번 모두 같게 하고, 힘의 크기와는 관계없이 각 9 cm³로 눌러준다(스페이스 링을 사용하면 편리하다). 젤이 빈 공간을 형성하지 않도록 주의하면서 액체와 젤을 60 mm 튜브 높이까지 채운다.

장전콜러를 아래쪽부터 튜브로 밀어주어 오리피스 판을 집어넣고 물리브듬 디설 파이드 게 윤활제를 약간 발라 준 후 너트를 조인다. 물질이 플랜지와 판, 나사에 묻어있지 않도록 해야 한다.

압력 조절장치(60 mbar ~ 70 mbar)가 장착된 산업용 실린더로 프로판을 공급하면서 매니폴드로 네 개의 버너를 연결해 골고루 가열한다(버너의 불꽃을 육안으로 볼 수 있게 한다). 그림 1과 같이 버너는 시험 챔버 주변에 놓는다. 네 개의 버너는 분당 3.2 리터의 프로판을 소모한다. 다른 연료용 가스와 버너를 사용할 수도 있으나 가열 속도는 그림 3을 따라야 한다. 어떤 기구이든, 그림 3의 디부틸 프탈레이트를 넣은 튜브를 이용해 가열 속도를 주기적으로 점검한다.

1.2.1.3 시험 수행

튜브가 분리될 때까지 최대 5 분간 튜브를 가열하여 시험을 한다. 튜브가 3 조각 ~ 4 조각으로 갈라지면 폭발성이 있는 것이다(경우에 따라 그림 2처럼 얇은 금속 스트립으로 이어진 경우도 있다). 나뉘는 금속 조각 수가 이보다 적거나 나뉘지 않는다면 폭발성이 없는 것이다.

6.0 mm 직경의 오리피스 판으로 첫 번째 시험을 세 번 시험하여 폭발이 일어나지 않으면, 2.0 mm 직경의 오리피스 판으로 두 번째 시험을 세 번 수행한다. 시험 중 폭발하면 더 이상 시험을 진행하지 않는다.

1.2.1.4 평가

위 두 시험 중 한 가지라도 폭발하면 시험 결과는 반응이 있는 것으로 간주한다.

1.2.2 기계적 감도(충격)

1.2.2.1 기구(그림 4)

보통의 낙하해머 장치의 필수 부분은 기판이 있는 주철벽돌, 모루, 컬럼, 가이드, 낙하용 추, 방출 장치, 견본 홀더이다. 철제 모루 100 mm(직경) x 70 mm(높이)를 캐스트 기판 450 mm(길이) x 450 mm(폭) x 60 mm(높이)이 있는 강철 벽돌 230 mm(길이) x 250 mm(폭) x 200 mm(높이)의 상단에 조여 준다. 이음매가 없는 강철 튜브로 된 칼럼을 강철벽돌 뒤쪽에 나사로 고정된 홀더에 고정한다. 네 개의 스크류가 기구를 단단한 콘크리트 벽돌 60 x 60 x 60 cm에 고정해 주고

있으며 가이드 레일은 수직으로 되어 추가 자유낙하 할 수 있게 되어 있다. 5 kg 및 10 kg 강철 추를 사용한다. 각 추가 충돌하는 헤드 부분은 강철(HRC 60 ~ HRC 63)로 되어 있으며 최소 직경은 25 mm이다.

두 개의 동축 강철 실린더로 된 충격 장치로 시험 견본을 에워싼다(하나는 위쪽, 다른 하나는 할로우 실린더 가이드 링). 강철 실린더는 직경 10(-0.003, -0.005) mm, 높이 10 mm로 표면은 광택을 내고, 가장자리는 둥글게 처리하였으며(곡률 반경 0.5 mm), 경도는 HRC 58 ~ HRC 65이다. 할로우 실린더는 외경 16 mm, 보링 10(+0.005, +0.010) mm, 높이 13 mm이다. 충격 장치는 중간 크기 강철 모루로 조립하고 (직경 26 mm, 높이 26 mm), 가운데 구멍을 내어 연기가 빠져나갈 수 있게 한다.

1.2.2.2 시험조건

견본 부피는 40 mm³로 하거나, 다른 기구의 부피에 맞게 한다. 고체 물질은 건조한 상태에서 시험하며 다음과 같이 준비한다.

- (1) 분말 물질은 체로 거른다 (체 크기 0.5 mm); 체를 통과한 물질만 시험에 사용한다.
- (2) 압축, 캐스트나 기타 압착된 물질은 작게 조각내어 체로 거른다. 체는 0.5 mm ~ 1 mm 직경으로, 원 물질을 대표할 수 있어야 한다. 반죽 상태 물질은 가능하면 건조상태로 시험하고, 어떤 경우이든 희석액은 최대한 없애야 한다. 액상 물질은 강철 실린더의 상단과 하단 간 1 mm의 공간을 두고 시험한다.

1.2.2.3 시험

10 kg 추를 0.40 m (40 J) 높이에서 떨어뜨리는 시험을 여섯 번 반복한다. 40 J, 6 회 시험 중 폭발하면, 5 kg 추로 0.15 m (7.5 J)에서 떨어뜨리는 시험을 여섯 번 반복한다. 다른 기구의 경우, 기존 절차를 이용해 견본을 선택한 대조물질과 비교해 본다(예, 업-앤-다운법).

1.2.2.4 평가

특정 충격 기구로 위 시험 중 한 번이라도 폭발하거나(불꽃이 나는 경우나 이에 준하는 반응이 일어난 경우), 다른 충격 시험에서는 1,3 - 디니트로벤젠이나 RDX 보다 감도가 큰 경우에는 견본이 시험 반응이 일어난 것으로 간주한다.

1.2.3 기계적 감도 (마찰)

1.2.3.1 기구 (그림 5)

마찰 기구는 마찰 장치에 장착된 주찰 기관으로 구성되어 있다. 이 장치가 도자기 썰기(Porcelain peg)와 이동식 도자기 판(Porcelain plate)에 고정되어 있다. 도자기 판은 두 개의 가이드가 있는 수레에 고정되어 있다. 수레는 도자기 판이 앞뒤로 10 mm 움직일 수 있게 연결막대, 전기 캠, 기어로 전기모터에 연결되어 있다. 도자기 썰기에는 120 N 이나 360 N의 힘을 줄 수 있다.

평판 도자기 판은 도자기 재질(강도 $9\ \mu\text{m} \sim 32\ \mu\text{m}$)로서 25 mm(길이) x 25 mm(폭) x 5 mm(높이) 크기이다. 실린더 형 도자기 썰기도 흰색 도자기 재질로 길이 15 mm, 직경 10 mm, 원형, 표면의 곡률은 10 mm이다.

1.2.3.2 시험조건

견본의 부피는 $40\ \text{mm}^3$ 로 하거나 다른 기구의 경우, 거기에 맞는 부피로 한다. 고체 물질은 건조한 상태에서 시험하며 다음과 같이 준비한다.

- (1) 분말 물질은 체로 거른다(체 크기 0.5 mm). 체를 통과한 물질만 시험에 사용한다.
- (2) 압축, 캐스트나 기타 압착된 물질은 작게 조각내어 체로 거른다. 0.5 mm ~ 1.0 mm 직경의 체가 사용된 것은 원래물질에 대한 대표성이 있어야 한다. 반죽 상태 물질은 가능하면 건조 상태로 시험하고, 건조 상태로 만들 수 없는 경우에는 반죽에서 희석액은 최대한 없애고 두께 0.5 mm, 폭 2 mm, 길이 10 mm의 막으로 미리 만들어 둔다.

1.2.3.3 시험

도자기 썰기를 시험 견본에 올리고 하중을 준다. 시험 시, 도자기 판의 스폰지 마크가 움직이는 방향과 수직이 되도록 한다. 썰기가 견본에서 떨어지지 않게 주의하고, 썰기 아래쪽에 물질이 충분하도록 하며, 판이 썰기 아래쪽에서 정확하게 움직이게 한다. 반죽형 물질의 경우, 0.5 mm 두께의 게이지(2 mm x 10 mm 슬롯)를 사용해 물질을 판에 올려준다. 도자기 판을 도자기 썰기 아래쪽에서 0.44 초의 시간 동안 앞뒤로 10 mm 움직여 준다. 판과 썰기의 각 표면은 한 번만 사용한다. 각 썰기의 양쪽 끝을 두 번 시험하고 판의 양쪽 표면은 세 번 시험한다.

360 N의 하중을 주어 6 회 시험한다. 이 6 회 시험 중 원하는 결과가 나오면, 120 N의 하중으로 6 회 더 시험한다. 다른 기구의 경우, 기존 절차를 이용해 견본을 선택한 대조물질과 비교해 본다(예, 업-앤-다운법).

1.2.3.4 평가

특정 마찰 기구로 위 시험 중 한 번이라도 폭발하거나(불꽃이 나는 경우나 이에 준하는 반응이 일어난 경우), 다른 마찰 시험의 경우라면 이에 준하는 결과가 나온 경우 견본에 시험 반응이 일어난 것으로 간주한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

열, 충격, 감도 시험에서 양성결과가 나온 경우에는 물질이 폭발위험이 있는 것으로 간주한다.

2. 결과해석 및 평가

시험 보고서에는 실수, 비정상적인 상황, 특별한 사항 등 모든 내용을 기재해야 한다. 어떠한 결과도 보고서에 실지 않았다면, 그에 대한 설명과 함께 다른 대체 및 보충 시험 결과를 기재한다. 비정상적인 결과를 설명할 수 있는 경우 이외에는, 실제 값을 받아들이고 이에 따라 물질을 분류해야 한다.

3. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험조건

(1) 시험 물질의 식별 정보, 조성, 순도, 수분함량 등

(2) 견본의 물리적 형태, 분쇄, 파쇄, 체에 거르는 작업 여부

3.5 시험결과

- (1) 열감도 시험 중 관찰 결과(예, 건분 질량, 조각 수 등)
- (2) 기계적 감도 시험 중 관찰 결과(예, 상당량의 연기, 예상되지 않은 상태의 연기 또는 분해, 화염, 불꽃, 보고 내용, 타닥거리는 소리 등)
- (3) 각 시험 결과, 다른 기구를 사용한 경우, 과학적 증거 이외 특정 기구를 사용했을 때 나온 결과와의 상관관계
- (4) 올바른 결과 해석을 위해 필요한 유사 산물 시험을 위한 참조 자료 등의 유용한 정보
- (5) 결과 해석에 필요한 추가적 특기 사항

별 첨

열감도 시험 재료규격(DIN 1623) 예시

(1) 튜브 : 재료규격 No 1.0336.505 g

(2) 오리피스 판 : 재료규격 No 1.4873

(3) 장전콜러(threaded collar) 및 너트 : 재료규격 No 1.3817

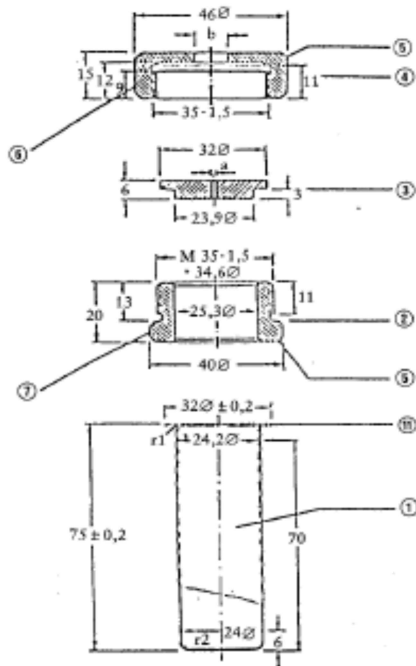


그림 1a 강철튜브와 부속품

- (1) 튜브
- (1a) 외부 플랜지
- (2) 장전콜러; 저-마찰 나사산
- (3) 오리피스 판 $a = 2,0$ 이나 $6,0 \text{ mm}$ 직경
- (4) 너트 $b = 10 \text{ mm}$ 직경
- (5) 둥근홈 표면
- (6) 41 스페너 용 플랫

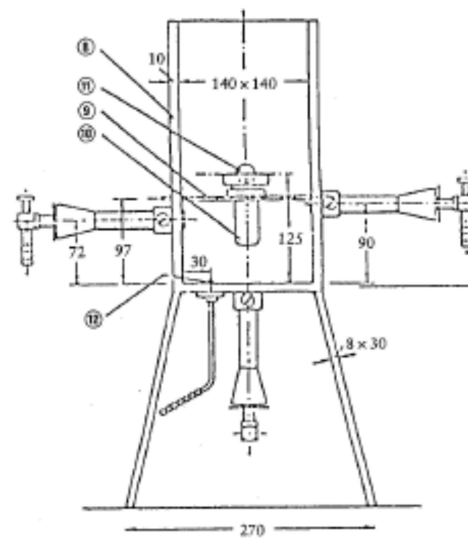


그림 1b 가열 및 보호장치

- (7) 41 스페너 용 2 플랫
- (8) 내파열성 박스
- (9) 튜브 용 지지대
- (10) 조립 튜브
- (11) 뒤쪽 버너 위치; 다른 버너는 그림에 보임
- (12) 예비 분사장치

그림 1. 열감도 측정장치 (치수 단위 : mm)

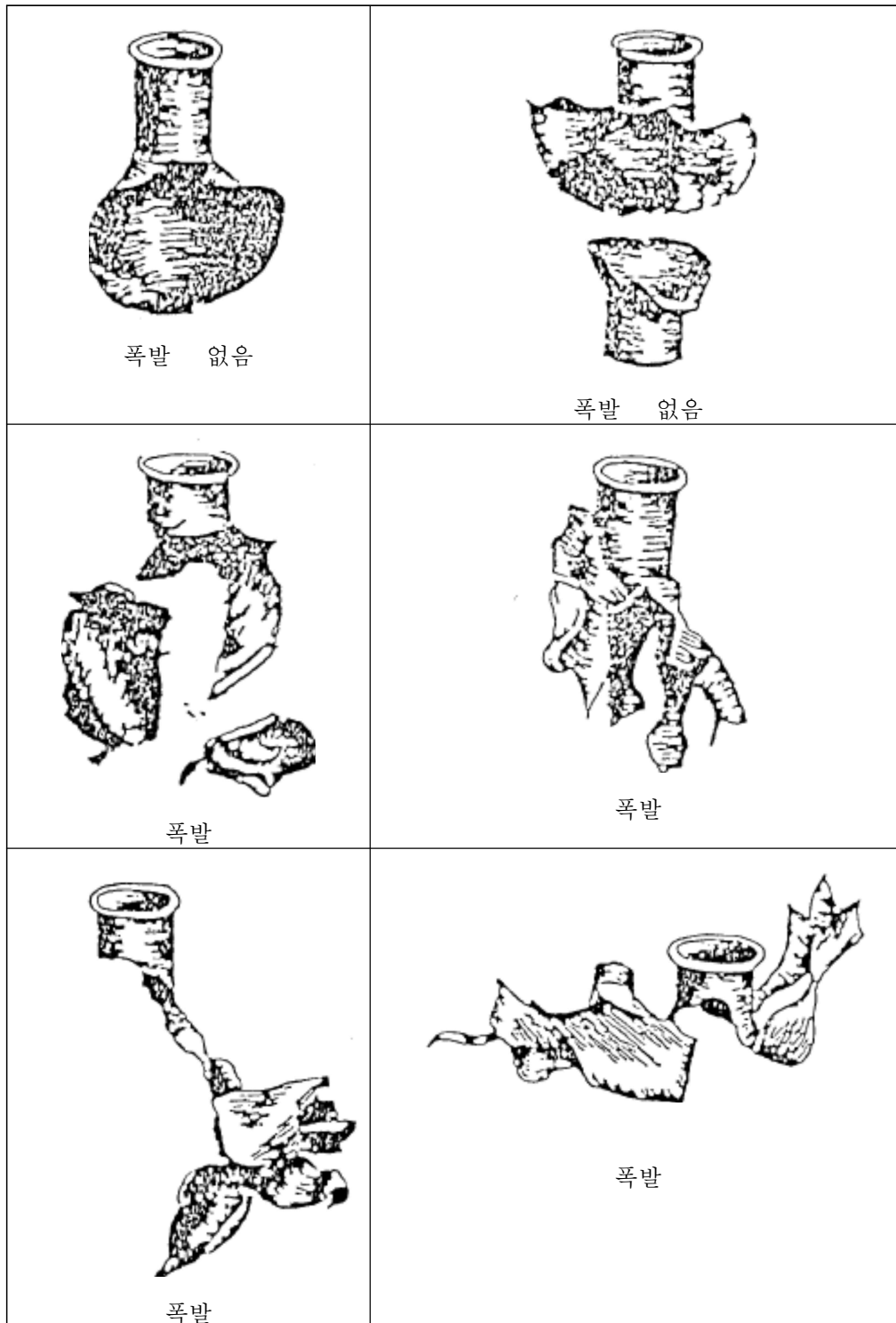


그림 2. 열감도 측정과편

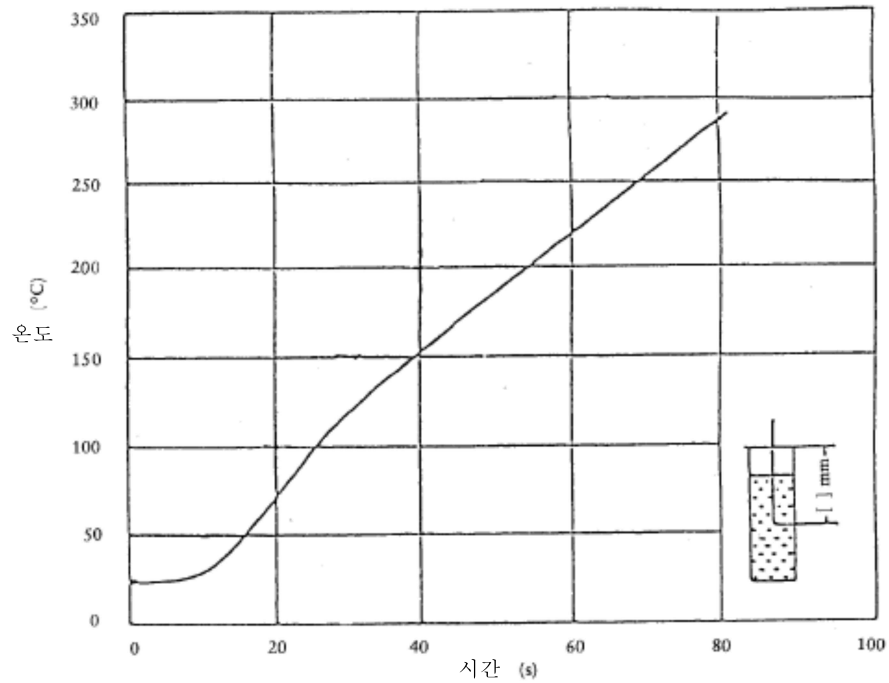


그림 3. 열감도 시험 용 가열 속도 조정. 디부틸 프탈레이트(27 cm^3)가열 시 온도/

시간 곡선, 밀폐 (1.5 mm 오리피스 판) 튜브, 3.2 리터/분 프로판 이용. 온도는 1 mm 직경 스테인리스스틸(크로멜/알루멜 열전대 외피)을 튜브 가장자리에서 43 mm 아래쪽 중앙에 놓아 측정하였다. $135\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 $285\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 가열하는 속도는 $185\text{ K/minute} \sim 215\text{ K/minute}$ 여야 한다.

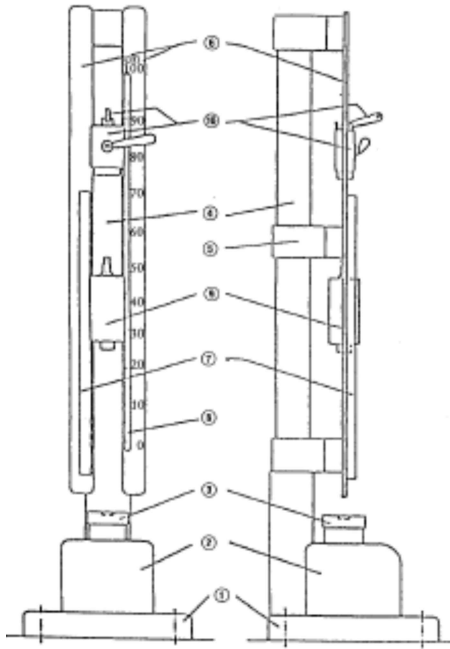


그림 4a 낙하-해머, 전면, 전체 조감도

- (1) 기판, 450 x 450 x 60
- (2) 강철 벽돌, 230 x 250 x 200
- (3) 모루, 100 직경 x 70
- (4) 클립
- (5) 중간 교차부
- (6) 가이드
- (7) 톱니 랙

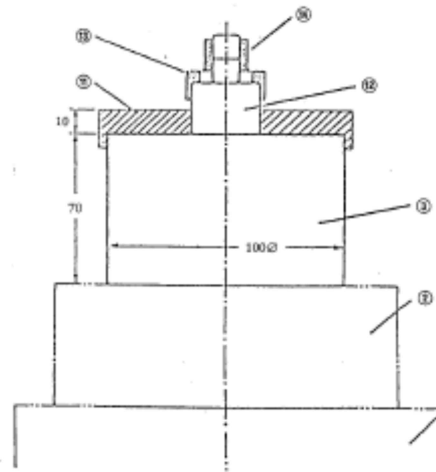


그림 4b 낙하-해머, 아래쪽

- (8) 눈금자
- (9) 낙하-해머(낙하물체)
- (10) 고정 장치, 방출 장치
- (11) 자리고정 판
- (12) 중간 모루 (교체 가능), 26 직경 x 26
- (13) 자리고정 링(오리피스)
- (14) 충격장치

그림 4. 충격 측정장치 (치수 단위는 모두 mm)

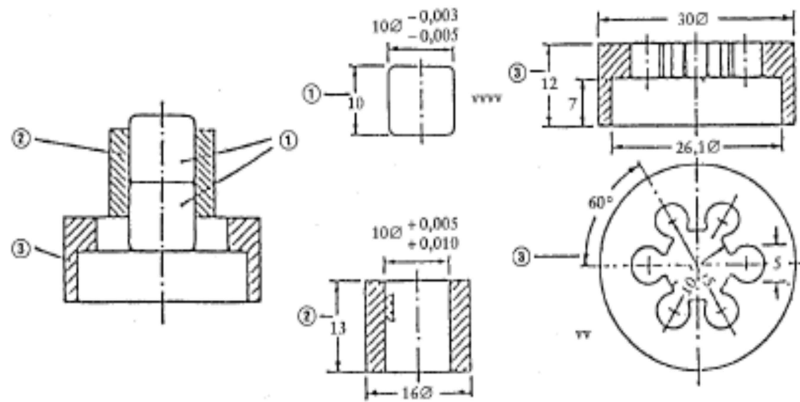


그림 4c 분말이나 반죽형 물질용 충격장치

- (1) 강철 실린더 (2) 강철 실린더 용 가이드 링
 (3) 자리고정 링(오리피스) (a) 수직 섹션 (b) 플랜
 (4) 고무링 (5) 액상 물질 (40 mm³)
 (6) 액체가 없는 공간

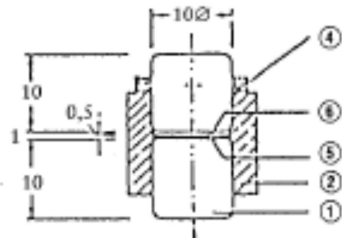


그림 4d 액상 물질 용 충격

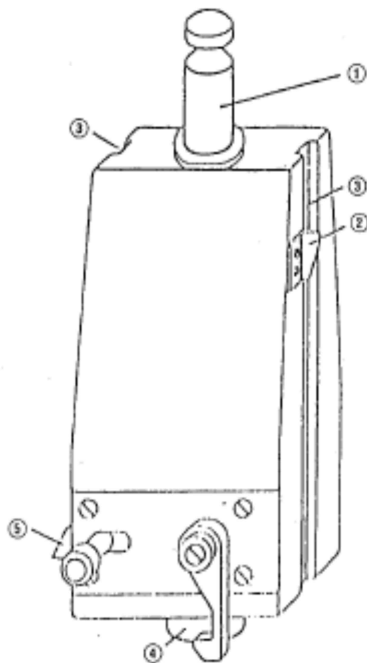


그림 4e 해머(낙하 질량 5 kg)

- (1) 현탁액 마개
 (2) 높이 마커
 (3) 위치지정 그루브
 (4) 실린더 형 타격 헤드
 (5) 리바운드 캐치

그림 4 계속. 충격 측정장치 (치수 단위는 모두 mm)

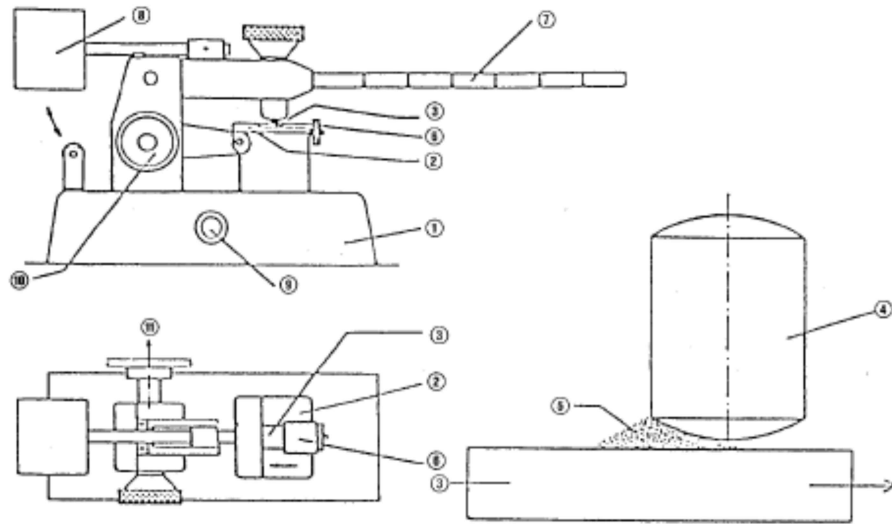


그림 5a 마찰기구; 측면도 및 평면도

- (1) 강철 기판
- (2) 이동식 수레
- (3) 도자기 판, 25 mm x 25 mm x 5 mm
- (4) 고정된 도자기 썰기, 10 직경 x 15 mm
- (5) 시험 건본, 약 10 mm³

그림 5b 건본 상 썰기의 시작 위치

- (6) 썰기 홀더
- (7) 하중 압
- (8) 평형추
- (9) 스위치
- (10) 수레 시작위치에 설치하는 휠
- (11) 전기 모터 방향

그림 5. 마찰감도 장치

제17항 자연발화성 및 자연발화점 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 어떤 고체 또는 액체가 착화원 없이 공기와의 접촉만으로 발화하는 성질이 있는지를 확인하고, 기체 또는 액체가 가열되면서 열이 축적되어 발화될 때의 온도를 측정하기 위한 것이다.

자연발화점의 측정은 상온에서 자연발화성이 있는 물질에 적용할 수 없으며, 공기가 존재하는 조건에서 뜨거운 표면조건에 의해 발화될 수 있는 기체, 액체 및 증기에 대하여 적용 가능하다.

2. 정의

- 2.1 자연발화성 : 상온(약 20 °C)에서 고체 또는 액체가 공기와 접촉한 후 5 분 이내에 자연발화 되는 경우 또는 액체를 흡수시킨 여과지가 발화되거나 검게 타는 경우
- 2.2 자연발화점 : 공기 중에서 시험물질이 화염, 불꽃 등의 점화원과 직접 접촉 없이 발화하는 최저온도. 또한, 자연발화의 정도는 자연발화온도로 나타내며, 자연발화온도는 이 시험방법에 따라 시험하였을 때 공기 중에서 시험물질이 점화하는 가장 낮은 온도

II. 시험

1. 자연발화성의 확인

본 시험은 소량으로 실온(약 20 °C)에서 공기와 접촉했을 때 자연발화 하는 고체나 액체 물질에 적용된다. 상온에서 장시간 공기와 접촉해야 하거나 인화 전에 온도를 높여야 하는 물질은 본 시험의 대상에서 제외한다.

1.1 기구

상온(약 20 °C)에서 약 10 cm 직경의 도자기 컵에 규조토를 약 5 mm 높이까지 채운다. 충전 물질로는 시험이 사고로 퍼질 경우를 대비해 불연성물질인 규조

토나 이와 대등한 불활성 물질을 이용한다. 또한, 불활성 용기와 접했을 때 인화하지 않는 액체의 경우 시험에 사용할 건조한 여과지를 준비한다.

1.2 분말형 고체

1 cm³ ~ 2 cm³의 시험 물질을 약 1 m 높이에서 1.1에 준비한 도자기 컵에 붓는다. 이 때 붓는 도중 또는 분말을 모두 부은 후 5 분 이내에 물질이 발화하는지 관찰한다. 발화되지 않으면 본 시험을 최대 6 회 반복한다. 6 회 반복시험 결과, 발화되지 않으면 자연발화성이 없는 것으로 확인한다.

1.3 액체

약 5 cm³의 시험액을 1.1에 준비한 도자기 컵에 붓고 5 분 안에 물질이 발화되는지 확인한다. 발화하지 않으면 본 시험을 최대 6 회 반복한다. 6 회 반복시험한 후에도 발화되지 않으면 다음 시험을 수행한다.

실린지로 0.5 mL의 시험물질을 움푹한 여과지에 옮기고 5 분 안에 여과지가 발화되거나 검게 타는지 관찰한다. 발화되거나 검게 타지 않으면 최대 3 회 반복 시험한다. 3 회 반복시험 결과, 발화되거나 검게 타지 않으면 자연발화성이 없는 것으로 확인한다.

2. 자연발화점

이 시험방법은 시험용기 안에 주입된 기체, 증기 또는 액체가 점화되는 용기 내부의 최소온도를 측정한다.

2.1 대조물질

IEC 79-4, DIN 51794, ASTM-E 659-78, BS 4056, NF T 20-037을 참조한다.

2.2 시험방법

2.2.1 기구

2.1의 방법 중 제시된 기구를 사용한다.

2.2.2 시험 조건

2.1의 방법 중 제시된 조건을 준수한다.

2.2.3 결과

시험온도, 대기압, 사용된 시료의 량 및 발화가 발생할 때까지의 지체시간을 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

자연발화성 확인실험에 있어서 안전이 중요하므로, 1 회 반응이 나타나면 자연 발화성이 있는 물질로 간주한다. 자연발화점 시험에서 시험결과는 온도의 범위 및 사용된 시험 방법에 따라 변화할 수 있으며 감도 및 특이성 또한 사용된 시험 방법에 따라 달라질 수 있다. 본 시험 항목은 안전과 관련이 있으므로 측정 결과 중 최저온도를 자연발화점으로 선택한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험 일자 및 조건

(1) 시험수행일자

(2) 시험일자의 온도, 습도 및 대기압력

2.4 시험물질

(1) 물질의 정확한 특성 (물질의 특성 및 순도, 불순물 정보 등)

(2) 입수처, 입수일

(3) 시험에 사용한 양

2.5 사용한 기구

2.6 시험결과

(1) 측정 결과 (시험온도, 자연발화점, 발화지연시간 등)

(2) 기타 시험과정에서 관찰된 특기사항 및 결과 해석에 필요한 부가 설명

제18항 산화성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 고체 물질의 산화성을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 연소 시간(Burning time) : 산화성 시험 시 트레이н(<그림>)을 따라 연소반응이 미리 정하여 둔 한 지점에서 다른 지점까지 이동하는데 걸리는 시간을 측정하여 초 단위로 표시

2.2 연소 속도(Burning rate) : 초당 밀리미터(mm/sec) 단위로 표시

2.3 최대 연소 속도(Maximum burning rate) : 10 % ~ 90 %의 산화제를 함유한 혼합물로 산화성 시험을 수행하였을 때 얻어진 최대 연소 속도

3. 대조물질

3.1 예비 시험 및 본 시험에 질산바륨(분석급)을 대조물질로 사용한다.

3.2 대조물질 혼합물은 분말 셀룰로오스와 질산바륨의 혼합물로 일반적으로 질산바륨 : 셀룰로오스의 질량비가 6 : 4인 혼합물에서 최대 연소 속도를 갖는다.

II. 시험

1. 시험의 준비

본 시험은 액체, 기체, 폭발성 물질, 고인화성 물질 또는 유기성 과산화물에는 적용되지 않는다. 시험물질이 가연성 물질과 발열 반응을 하지 않을 가능성이 있는 경우에 수행하며 구조식을 알아보기 위한 목적으로 수행할 필요는 없다.

시험물질의 폭발성에 대한 정보는 시험에 유용한 정보를 제공한다. 시험을 수행할 때 특별한 주의를 기울여야 하는지 알아보기 위해 예비 시험을 수행해야 한다.

1.1 장치 및 기구

트레인 시험에 필요한 장치의 모식도는 별첨의 <그림>을 참조한다.

1.2 시험물질의 준비

시험물질을 체에 거르고 남은 부분은 분쇄한 뒤 다시 체에 거르는 과정을 시험물질 전량이 체를 통과할 때까지 반복하여 시험물질의 입자 크기가 0.125 mm 이하가 되도록 준비한다. 준비된 시험물질을 105 °C에서 항량에 도달할 때까지 건조시킨다. 105 °C 이하에서 시험물질이 분해되는 경우에는 이보다 낮은 온도에서 건조시킨다.

1.3 연소성 물질(Combustible substance)

연소성 물질로는 박층 크로마토그래피 또는 컬럼 크로마토그래피용 분말 셀룰로오스를 사용한다. 섬유 길이가 0.020 mm ~ 0.075 mm 사이인 셀룰로오스를 85 % 이상 함유한 것이 적합하며 0.125 mm 체로 거른 셀룰로오스 분말을 사용한다. 시험에는 동일한 배치의 셀룰로오스를 사용한다. 분말 셀룰로오스를 105 °C에서 건조시켜 항량에 도달하도록 한다.

예비 시험에 톱밥을 사용하는 경우, 1.6 mm 체를 통과한 톱밥을 모아서 잘 섞은 뒤 두께가 25 mm가 넘지 않도록 하여 105 °C에서 4 시간 건조시켜 사용한다. 톱밥을 식힌 뒤, 밀폐 용기에 보관하며 24 시간 이내에 사용하는 것이 좋다.

1.4 점화원

점화원으로는 직경 5 mm 이상의 가스버너를 사용하며 다른 점화원을 사용하는 경우(예, 불활성 대기 하에서 시험하는 경우 등), 점화원에 대한 설명 및 사유를 기록해야 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

산화성 시험은 안전 측면에서 수행되는 시험이다. 예비 시험에서 시험물질이 명확히 산화성을 보이는 경우에는 추가 시험을 수행하지 않아도 된다. 그렇지 않은 경우에는 본 시험을 수행한다. 본 시험에서는 시험물질과 연소성 물질을 다양한 비율로 혼합하여 만든 혼합물에 대해 최대 연소 속도를 구하고 대조물질의 최대 연소 속도와 비교한다.

2.2 예비 시험

시험물질을 건조시킨 셀룰로오즈(또는 톱밥)와 2 : 1의 비율(질량비)로 섞은 뒤, 원뿔 모양의 용기(예, 아래 부분을 막은 실험용 유리 깔대기 등)에 채워 바닥 직경 3.5 cm, 높이 2.5 cm의 원뿔 형태로 시료를 준비한다.

준비된 시료를 불연성의 열전도성이 낮고 구멍이 없는 평판(Base plate)에 놓는다. 흡 후드 내에서 원뿔에 점화원을 접촉하고 반응의 격렬도와 시간을 관찰하고 기록한다. 반응이 격렬하면 시험물질은 산화성 물질로 간주한다. 시험 결과가 의심스러운 경우, 실물 규모의 트레인 시험을 수행하여야 한다.

2.3 트레인 시험(본 시험)

10 % ~ 90 %의 범위에서 연소성 물질(셀룰로오즈)을 10 %씩 증가시켜가면서 시험물질과 연소성 물질의 혼합물을 준비한다. 시험 결과가 경계 값인 경우, 중간 단계의 혼합물을 사용하여 정확한 최대 연소 속도를 구한다. 시료는 <그림>과 같은 금속 주형을 이용하여 만든다. 금속 주형은 길이 250 mm, 안쪽 높이 10 mm, 안쪽 폭 20 mm의 삼각형 단면을 갖는 형태이다. 주형의 양쪽 측면은 삼각형 단면 상단에서 2 mm 올라오도록 삼각형 금속판을 장착하여 막는다. 시험물질과 연소성 물질의 혼합물을 약간 과량 넣어준다. 주형을 2 cm 높이에서 고체 표면으로 떨어뜨린 뒤, 판 위에 남은 물질은 닦아낸다. 금속판을 제거하고 남은 분말은 롤러를 사용하여 매끈하게 만든다. 주형 상단에 불연성의 열전도성

이 낮고 구멍이 없는 평판을 올린 다음, 기구를 뒤집어 주형을 제거한다.

흡 후드에 시료를 놓고 공기의 속도를 충분히 하여 연기가 실험실 밖으로 빠져나가지 않도록 한다. 시험 중에는 공기의 속도를 바꾸지 않는다.

장치 주변에 차폐막을 세운다. 셀룰로오즈 및 몇몇 시험물질은 흡습성이 있으므로 가능한 빠르게 시험을 수행한다. 시료의 한쪽 끝에 불을 붙이고 반응이 발화점으로부터 30 mm 지난 지점부터 200 mm 지점까지 이동하는데 소요되는 시간을 측정한다.

대조물질을 이용하여 시험을 수행하고 시험물질과 셀룰로오즈 혼합물을 혼합 비율별로 최소 한 번씩 시험을 수행한다. 최대 연소 속도가 대조물질보다 현저히 큰 경우 시험을 중단할 수 있으며 그 외의 경우에는 가장 빠른 연소 속도를 보인 혼합물 세 개에 대해 각각 6 회 반복 실험을 수행한다.

시험 결과가 의양성(False positive)인지 의심스러운 경우에는 입자 크기가 비슷한 키젤거(Kieselguhr) 등의 불활성 물질을 사용하여 시험을 수행하거나 가장 빠른 연소 속도값을 보였던 혼합물에 대해 불활성 대기(산소비 2 %(w/w) 이하) 상에서 시험을 수행한다.

2.4 시험환경

연소성 물질로 사용하는 셀룰로오즈(또는 톱밥)와 산화성 물질의 혼합물은 폭발 가능성이 있으므로 조심해서 다루도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 다음의 경우 시험물질은 산화성 물질로 간주한다.

- (1) 예비 시험에서 반응이 격렬하게 일어난 경우
- (2) 트레인 시험에서 시험물질 혼합물의 최대 연소 속도가 대조물질 혼합물(셀룰로오즈와 질산바륨 혼합물)의 최대 연소 속도와 같거나 그 이상인 경우

- 1.2 시험물질과 가연성 물질 혼합물에 대해 6 회 시험을 수행하고 가연성 물질 농도에 대한 연소 속도 그래프로부터 최대 연소 속도를 구한다. 최대 연소 속도를 대조물질의 최대 연소 속도와 비교한다.
- 1.3 최대 연소 속도를 보인 비율의 혼합물로 6 회 반복 시험을 수행하여 얻은 연소 속도가 그 산술 평균값과 10 % 이상 차이가 나지 않아야 하며 그렇지 않은 경우 시험물질의 분쇄 또는 혼합 방법을 개선하여야 한다.
- 1.4 불활성 대기 상에서 시험을 수행한 경우 최대 반응 속도는 동일한 조건에서 시험을 수행한 대조물질 혼합물과 비교한다.
- 1.5 의양성 결과를 피하기 위해 결과 해석 시 불활성 물질 혼합물을 이용한 실험 결과나 불활성 대기 상에서 실험한 결과를 고려한다.

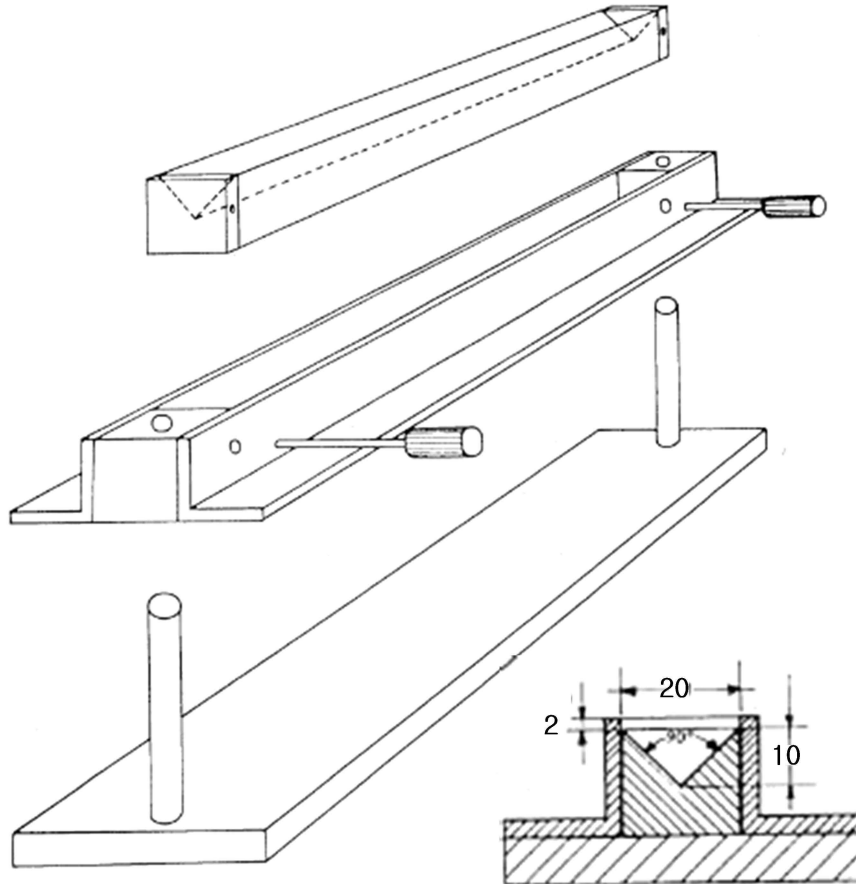
2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

- 2.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 2.3 시험물질
 - (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도 또는 수분함량
- 2.4 시험조건
 - (1) 시험에 사용한 점화원
 - (2) 시험물질 처리 방법(예, 분쇄, 건조 등)
- 2.5 시험결과
 - (1) 측정 결과
 - (2) 반응 방식(예, 표면 불꽃 연소, 전체적인 연소, 연소산물에 대한 정보 등)

- (3) 연소의 격렬한 정도(화염, 불꽃, 연기, 느린 연소 등)를 포함하여 결과 해석과 관련된 사항
- (4) 예비 안전/선별 시험을 통해 얻은 시험물질 및 대조물질의 적절한 시간
- (5) 불활성 물질 시험 결과(해당사항이 있는 경우)
- (6) 불활성 대기 상에서의 시험결과(해당사항이 있는 경우)
- (7) 결과에 대한 고찰 및 결론

별 첨



<그림> 시료준비에 필요한 주형과 부속품 그림(단위 : mm)

제19항 회분식 평형방법을 사용한 흡착 및 탈착 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 다양한 범위의 유기 탄소 함량, 점토 함량, 토성, pH를 가진 여러 가지 토양에서 화학물질의 흡착특성을 평가하는 것이다. 흡·탈착시험을 통해 화학물질의 이동성과 환경매체 내 분포특성을 파악하는 데 필요한 정보를 제공하고자 한다.

2. 정의

2.1 흡착율 :

시험조건에서, 시험 후 토양에 흡착된 물질 양을 시험 초기에 시험관에 존재하는 물질의 양으로 나눈 값의 백분율(%)

2.2 흡착 등온방정식 :

평형상태에서 용액에 남아있는 시험물질의 농도와 흡착된 시험물질의 양에 관한 공식

2.3 질량균형 :

흡착시험 후 회수된 물질의 양(토양에 존재하는 양과 용액에 존재하는 양의 합)을 시험초기 물질의 양으로 나눈 값의 백분율(%)

2.4 탈착율 :

시험조건에서, 탈착시험 후 탈착된 시험물질의 양을 흡착 시험에서 토양에 흡착된 물질 양으로 나눈 값의 백분율(%)

2.5 탈착 등온방정식 :

탈착평형상태에서 용액에 남아있는 시험물질의 농도와 토양에 흡착된 시험물질의 양에 관한 공식

2.6 분배계수(K_d) :

시험조건에서 흡착평형에 도달하였을 때 토양에 있는 물질의 농도($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)를 용액에 남아있는 물질의 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)로 나눈 값 ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

2.7 유기탄소 표준흡착계수(K_{oc}) :

분배계수를 토양 중 유기물 양으로 나누어 표준화 한 값($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$). 100을 토양시료 중 유기물 함량(%)으로 나눈 값과 분배계수(K_d)를 곱하여 계산함.

2.8 탈착평형계수(K_{des}) :

탈착평형에 도달한 시점을 기준으로 토양에 남아있는 시험물질의 양을 탈착되어 용액에 존재하는 시험물질의 양으로 나눈 값 ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

2.9 토양시료 무게 :

건조기로 말린 토양의 무게(g)

2.10 반수 분해 시간(DT-50) :

투여된 시험 물질의 50 %가 분해되는 데 걸리는 시간.

2.11 물질수지 :

흡착 시험이 끝난 후 분석으로 회수될 수 있는 물질의 양과 시험시작단계에서 초기 물질의 양의 비율

3. 시험의 범위

본 시험에서 흡착이란 화학물질이 토양의 표면과 결합하는 과정을 말한다. 그러나 표면에서 일어나는 촉매에 의한 분해와 용적흡착, 화학반응 같은 과정과 물리적 화학적 흡착과정을 구분하지 않는다. 또한 토양의 콜로이드 입자(직경 $< 0.2 \mu\text{m}$)에서 발생하는 흡착 역시 별도로 고려하지 않는다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

이 시험은 다양한 토성을 가진 토양에 대한 화학물질의 흡착을 평가하기 위한 것으로, 3 단계로 이루어져 있다.

(1) 1 단계 시험 : 예비 시험으로 아래 항목의 값을 결정한다.

- 토양/용액 비율
- 흡착을 위한 평형 시간, 평형상태에서 흡착된 시험 물질의 양
- 시험물질이 시험용기에 흡착되는지 여부 및 시험기간 동안 물질의 안정도

(2) 2 단계 시험 : 선별시험으로 아래 항목의 값을 결정한다.

- 단일농도에서 흡착열역학을 이용해 5 개의 다른 토양의 흡착을 시험하고, 분배 계수 (K_D , K_{OC})를 결정

(3) 3 단계 시험 : 흡착 및 탈착 등온방정식 결정시험

- Freundlich 흡착 등온방정식 계산 : 토양에서 흡착 정도에 대해 농도가 미치는 영향을 결정하기 위해 계산
- 탈착 열역학을 이용한 탈착연구 및 Freundlich 탈착 등온방정식 계산

1.2 시험물질의 특성

1.2.1 물질의 선택

시험용 물질은 분석용 등급을 사용한다. 인식표가 붙지 않은 시험물질의 경우에는 조성을 알고 있고 적어도 95 %의 순도를 가지고 있어야 하며, 방사성표시 물질인 경우는 성분조성과 방사선 순도를 알고 있는 경우에 사용한다. 반감기가 짧은 방사선추적자는 붕괴 보정을 적용해야 한다.

1.2.2 물질의 정보

흡착/탈착에 대한 시험을 하기 전에 시험물질에 대해 아래와 같은 정보가 있어야 한다.

(1) 물 용해도

- (2) 증기압 혹은 Henry 상수
- (3) pH에 따른 비생물적인 가수분해
- (4) n-옥탄올/물 분배 계수
- (5) 생분해성 혹은 토양에서 호기성 및 혐기성 변형
- (6) 이온화 되는 물질의 경우 pKa 값
- (7) 물에서 직접 광분해 여부(물에서 UV-VIS 흡수 스펙트럼, 양자 효율), 토양에서 광분해 여부

1.3 시험의 적용 범위

1.3.1 이 시험은 정확도가 높은 분석법이 확보된 화학물질에 대해 적용할 수 있다.

특히 간접 방법을 사용하는 경우, 시험 시간에 따른 시험물질의 안정도는 결과의 신뢰도에 영향을 줄 수 있는 중요한 변수가 된다. 따라서 예비 시험을 통해 안정도를 확인하는 것이 필요하다. 시험시간에 따라 물질이 변형되는 것이 관찰되면, 본시험에서는 토양과 액상을 모두 분석하는 것을 권장한다.

1.3.2 물 용해도가 낮은 ($< 10^{-4}$ g/L) 물질과 전하량이 높은 물질은 액상 농도를 정확하게 분석하기 어렵기 때문에 이 시험을 적용하기 어렵다. 이런 경우에는 추가적인 단계가 필요하다.

1.3.3 휘발성 물질은 시험기간 동안 손실이 발생하지 않도록 조심해야 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

2.1.1 간접법 : 건중량을 알고 있으며, 0.01 M 염화칼슘으로 미리 평형상태를 맞춘 토양에 0.01 M 염화칼슘을 포함하고 있으며, 비표지 또는 방사성 표지가 된 시험물질 용액 일정량을 넣는다. 이 혼합물을 일정시간 동안 저은 후, 원심분리기로 상등액을 분리한 다음, 여과하여 분석한다. 토양 시료에 흡착된 시험 물질의 양과 흡착된 초기에 용액에 있는 시험 물질의 양, 그리고 시험 후 남아있는 양의 차이로 계산한다.

2.1.2 직접법 : 흡착된 시험 물질의 양을 토양 분석을 통해 직접 확인 하는 방법이다. 이 방법은 용매를 이용하여 단계적으로 토양을 추출하여 분석하는 번거로운 방법이지만, 시험 물질의 용액 농도 차를 정확하게 결정할 수 없는 경우 이 방법을 사용한다. 예를 들면, 시험 용기 표면에 시험 물질의 흡착되는 경우, 시험기간 동안 시험 물질이 불안정한 경우, 흡착이 약해 용액상의 농도 변화가 작은 경우, 흡착이 너무 강해서 용액상의 농도가 정확히 측정할 수 없을 정도로 낮아지는 경우 등이 해당된다. 방사선 표지 물질을 사용하는 경우, 연소나 섬광 측정을 사용하여 토양 상 분석을 함으로써, 토양 추출을 안 할 수 있다. 하지만 액체 섬광 측정은 시험 물질과 시험 물질의 변형 생성물을 구별할 수 없는 기술이므로 시험용 화학물질이 시험 기간 동안 안정하게 유지되는 경우에만 이 방법을 사용해야 한다.

2.2. 시험도구

2.2.1 시험용 용기와 관

- (1) 원심분리기 장치에 꼭 맞아 취급과 이동할 때 오차발생을 최소화 할 것
- (2) 시험 물질이 표면에 흡착되는 것을 최소화 할 수 있는 불활성 재질

2.2.2 진탕장치 : 진탕되는 동안 토양이 계속 현탁상태를 유지할 수 있는 오버헤드 진탕기 혹은 이와 동등한 장비.

2.2.3 원심분리기 : 원심분리력 3,000 g 이상, 자동온도조절장치, 수용액에서 직경이 0.2 μm 이상인 입자를 제거할 수 있는 고속 원심분리기. 용기는 휘발성 물질과 용액의 손실을 방지하기 위해 뚜껑이 있어야 하며, 흡착을 최소한으로 하기 위해, PTFE(테플론[®])처리된 나사형 뚜껑을 사용한다.

2.2.4 여과기(선택사항) : 0.2 μm 크기의 1 회용 다공성 무균 여과지 사용. 여과지에 시험 물질이 남아있지 않도록 여과지 재질을 선택할 때 주의해야 한다. 난용성 시험 물질에는 유기성 여과지를 사용하지 않는 것이 좋다.

2.2.5 시험 물질의 농도를 측정하기에 적절한 분석 기구

2.2.6 실험실 오븐 : 온도를 103 $^{\circ}\text{C}$ ~ 110 $^{\circ}\text{C}$ 사이로 유지

2.3 시험용 토양

2.3.1 토양 특성 결정 및 토양 선택

- (1) 토양 특성은 흡착 용량에 영향을 주는 3 개의 요인(유기 탄소, 점토 함량, 토성)과 pH에 의해 구분된다. 기타 유효 양이온 치환용량, 철 및 알루미늄 산화물 함량, 화산재 같은 토양의 물리화화적인 성질도 토양에서 특정 물질의 흡착/탈착에 영향을 줄 수 있으므로, 이런 경우를 고려해야 한다.
- (2) 토양 특성을 결정하는 방법은 선택방법에 따라 결과에 상당한 영향을 줄 수 있다. 따라서 토양 pH는 ISO 방법(ISO 10390-1)에 따라, 0.01 M 염화칼슘 용액에서 측정하는 것을 권장하고 있다. 다른 토양 특성 또한 ISO 토양 분석 편람 같은 표준 방법에 따라 결정하는 것을 권장하고 있다. 토양시험법을 보정하거나, 표준토양을 사용하는 것 역시 고려한다.
- (3) 흡착/탈착 시험용 토양을 선택하기 위한 지침을 표 1에 나타내었다. 표에 나타난 7 개 토양은 온대지방에서 전형적으로 볼 수 있는 토양형태 이다. 시험물질의 이온화 여부에 따른 흡착여부를 평가하기 위해서는 토양 pH를 넓은 범위에서 측정한다.
- (4) 다른 기후대 토양이 사용될 때는 기준이 정확히 일치하지 않더라도 특성상 <표>에서 설명하는 변수와 유사한 변수를 가진 토양을 사용한다.

<표> : 흡착/탈착용 토양 시료 선택에 대한 지침

토양 형태	pH 범위 (0.01 M CaCl ₂ 속의)	유기 탄소 함량 (%)	점토 함량 (%)	토성*
1	4.5 ~ 5.5	1.0 ~ 2.0	65 ~ 80	점토
2	> 7.5	3.5 ~ 5.0	20 ~ 40	식양토(clay loam)
3	5.5 ~ 7.0	1.5 ~ 3.0	15 ~ 25	미사질 양토(silt loam)
4	4.0-5.5	3.0 ~ 4.0	15 ~ 30	양토
5	< 4.0 ~ 6.0 [§]	< 0.5 ~ 1.5 ^{§†}	< 10 ~ 15 [§]	양질 사토(loamy sand)
6	> 7.0	< 0.5 ~ 1.0 ^{§†}	40 ~ 65	식양토/점토
7	< 4.5	> 10	< 10	토사/양질사토

* FAO 및 미국 시스템 기준(85)

§ 각 변수는 주어진 범위에 있어야 한다. 하지만 적절한 토양이 없는 경우 각 변수에서 최솟값 이하인 것을 사용한다.

† 유기물 함량이 0.3 % 이하인 토양은 유기물 함량과 흡착간의 상호관계가 맞지 않을 수 있으므로, 최소한 유기물 함량이 0.3 %이상인 토양을 사용한다.

2.3.2 토양의 채취와 저장

- (1) 시료채취 기술은 연구목적에 따라 다르게 되므로, 공식적으로 특정 토양 시료채취 기술이나 기구를 추천하지는 않는다.
- (2) 채취지점의 이력에 대한 상세한 정보가 필요하다. 필요한 정보에는 위치, 표층 식물, 살충제와 비료의 살포이력, 생물학적인 이식이나 사고에 의한 오염 등이 포함된다. 시료채취 지역에 대한 기록은 ISO의 토양 시료채취 표준(ISO 10381-6)을 따른다.
- (3) 시료채취 위치는 UTM 좌표계나 지리학적 좌표를 정확하게 기록한다. 또한 시료채취는 최대 20 cm 깊이까지 존재하는 A층을 대상으로 한다. 특히 <표>의 토양 번호 '7'에 해당하는 경우에는 O_h층이 토양의 일부로 있을 경우 함께 채취한다.
- (4) 토양 시료는 보관용 용기에 넣은 후 시료채취 당시의 토양 특성의 변하지 않는 온도 조건을 유지하여 옮긴다.
- (5) 토양은 채취한 직후의 신선한 상태에서 사용하는 것이 좋으나, 불가피 할 경우 풍건상태로 일반 대기 온도에 저장한다. 저장기간에 대한 제한은 없으나, 3 년 이상 저장된 토양은 사용하기 전, 유기 탄소 함량, pH, CEC 등을 재분석해야 한다.

2.3.3 시험용 토양 시료의 취급 및 조제

- (1) 토양은 일반적인 대기 온도(20 °C ~ 25 °C)에서 풍건하며, 원래의 토양 조직이 변하지 않도록 약한 힘으로 덩어리를 잘게 부순다. 토양은 2 mm체를 사용하여 체질하며, ISO 체질 과정 표준(ISO 10381-6)을 따른다. 결과의 재현성을 높이기 위해 토양을 균질하게 섞는다.
- (2) 토양의 수분 함량은, 3 개의 검체를 항량이 될 때까지(약 12 시간), 105 °C로 가열하여 결정한다. 토양과 관련된 모든 계산에서, 토양의 질량은 오븐에서 건조한 질량, 즉 수분 함량을 보정한 토양 무게를 말한다.

2.4 시험용 물질의 제조

2.4.1 증류수나 탈이온수에 녹인 0.01 M 염화칼슘 용액에 시험물질을 용해시킨다.

염화칼슘용액은 원심분리효율을 높이고, 양이온 치환을 최소화하기 위한 용매로 사용된다. 저장용 용액의 농도는 사용되는 분석 방법의 검출 한계보다 3배 이상 높아야 한다. 또한 저장용 용액 농도는 시험 물질의 물 용해도보다 낮아야 한다.

2.4.2 저장용 용액은 토양 시료에 처리되기 직전에 만드는 것이 좋으며, 4 °C의 어두운 곳에 저장한다. 저장기간은 시험 물질의 안정도와 용액의 농도에 따라 다르다.

2.4.3 용해보조제는 용해도가 낮은 물질($S_w < 10^{-4}$ g/l)만 사용한다. 용해보조제는 메탄올 혹은 아세토니트릴과 같은 용매와 잘 섞여야 하며, 농도는 저장용 용액 총량의 1 %를 초과하면 안 된다. 또한 첨가된 양이 토양과 접촉할 시험 물질 용액보다 작아야 한다(0.1 % 미만). 시험 물질과 용매 분해반응을 하면 안 되며, 계면활성제는 안 된다. 결과를 보고할 때, 용해보조제 사용의 정당성을 제출해야 한다.

2.4.4 용해도가 낮은 물질을 처리하는 또 다른 방법은 시험 물질을 시험계에 직접 첨가하는 것이다. 시험물질을 유기용매에 녹인 후 일정량을 토양과 증류수나 탈이온수에 용해시킨 0.01 M 염화칼슘 용액과 토양에 각각 첨가한다. 액상 중 유기용매 함량은 최대한 낮게 해야 하며, 보통 0.1 % 미만으로 한다. 그러나 유기용매로부터 직접 주입하며, 부피 재현성이 어렵다는 것을 명심해야 한다. 결론적으로, 시험 물질과 보조용매의 농도가 모든 시험에서 정확하게 같지 않기 때문에, 또 다른 오차가 발생할 수 있다.

2.5 시험 전 준비사항

2.5.1 분석방법

- (1) 흡·탈착 측정의 정확도에 영향을 줄 수 있는 주요 요인에는 용액 및 흡착되는 상에 대한 분석 방법의 정확도, 시험 물질의 안정도 및 순도, 흡·탈착 평형상태 유지, 용액 농도의 변화 정도, 평형상태에 도달하는 과정에서 토양/용액 비율과 토양 구조의 변화 등이 있다(부록 3 참고).

- (2) 사용되는 분석 방법의 신뢰도는 시험기간 전반에 걸쳐 사용되는 농도 범위에서 확인해야 한다.
- (3) 일정량의 0.01 M 염화칼슘 용액(예 ; 100 cm³)에 유기 탄소와 점토 함량이 높아 흡착능력이 좋은 토양 적당량(예 ; 20 g)을 넣어 4 시간 동안 진탕한다. 이때 토양무게와 용액의 부피는 분석에 따라 다를 수 있지만, 기본적으로 토양/용액비율은 1 : 5로 한다. 혼합물은 원심 분리한 다음 액상을 여과한다. 시험 농도 범위 내에서 명목상 농도에 맞추기 위해 시험 물질 저장 용액을 일정량 여과액에 첨가한다. 그러나 사전 평형상태의 용액 특성이 변하면 안 되므로, 첨가되는 양은 최종 액상 부피의 10 %를 초과하면 안 된다. 이후 용액을 분석한다.
- (4) 분석 과정과 토양입자에 의한 효과와 분석법에서 생기는 인위적인 영향을 확인하기 위해, 시험물질이 첨가되지 않은 토양 + 염화칼슘 용액으로 만든 1개의 바탕 시험군을 포함해야 한다.
- (5) 분석에는 기체-액체 크로마토그래피, 고성능 액체 크로마토그래피, 분광광도법, 액체 섬광측정기(방사선 동위원소물질 용) 같은 장비가 사용된다. 적용되는 분석법의 회수율은 명목농도를 기준으로 90 % ~ 110 % 사이에 있어야 한다. 분배가 이루어진 다음에도 분석과 평가가 가능하기 위해서는 검출 한계가 적어도 명목 농도보다 1/100 이하이어야 한다.

2.5.2 최적의 토양/용액 비율 결정

- (1) 분배 계수 K_d 와 요구되는 상대 흡착 수준에 따라 흡·탈착 연구에서 적절한 토양/용액 비율이 결정된다. 측정에 대한 통계적 정확도는 흡착 방정식의 종류와 분석 방법의 한계를 바탕으로 한 용액내 물질 농도의 변화에 의해 결정된다. 그러므로 일반적으로 흡착율을 20 %이상, 가능하면 50 % 이상의 고정된 비율을 설정하는 것이 유용하므로, 용액에서 시험 물질 농도는 측정의 정확성을 유지할 수 있을 정도로 충분히 높은 농도를 유지해야 한다. 특히 흡착율이 높은 경우는 이것이 중요하다.
- (2) 적절한 토양/용액 비율을 선택할 때는 예비 시험이나, 평가 기술(부록 4)을 이용하여 추정된 K_d 값을 근거로 하는 것이 편리하다. 토양/용액 비율과 고정된

흡착율에 대한 K_d 값을 함수로 하는 그래프(그림 1)를 만들어 적절한 토양/용액 비율을 선택한다. 이 그래프에서, 흡착 방정식은 식 (1)과 같은 선형 방정식이라고 가정한다. 응용할 관계식은 식 (2)와 같이 K_d 값 방정식을 재정리해서 얻거나, 혹은 식 (3)과 같이 $R = m_{\text{soil}}/V_0$ 및 $A_{\text{eq}}\%/100 = m_s^{\text{ads}}(\text{eq})/m_0$ 로 가정하고 \log 값을 구하여 얻는다.

$$C_s^{\text{ads}}(\text{eq}) = K_d \cdot C_{\text{aq}}^{\text{ads}}(\text{eq}) \quad (1)$$

$$\frac{V_0}{m_{\text{soil}}} = \left(\frac{m_0}{m_s^{\text{ads}}(\text{eq})} - 1 \right) K_d \quad (2)$$

$$\log R = -\log K_d + \log \left[\frac{(A_{\text{eq}}\%/100)}{(1 - A_{\text{eq}}\%/100)} \right] \quad (3)$$

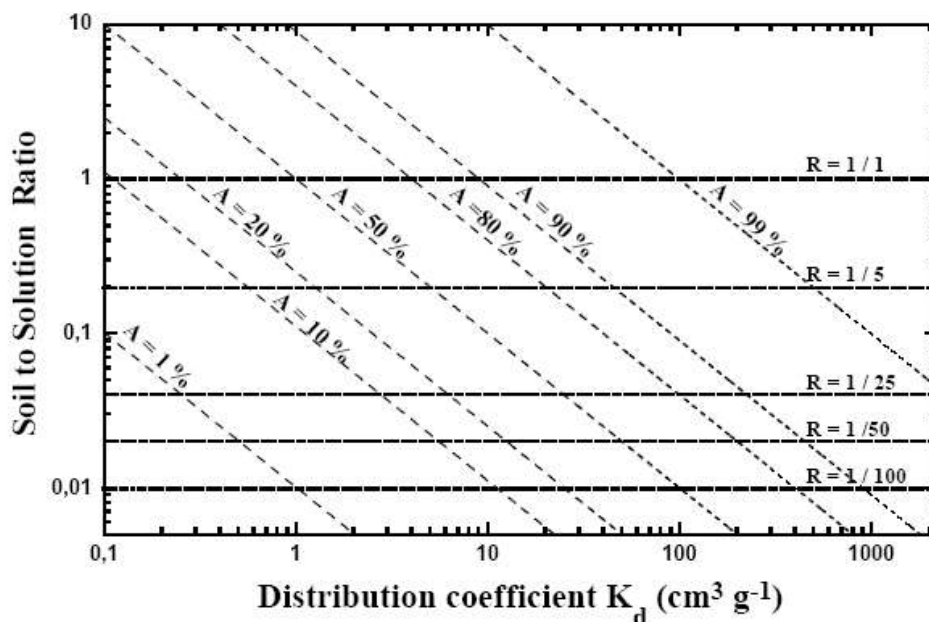


그림 28. 다양한 흡착 시험 물질 함량(%)에서 토양/용액 비율과 분배 계수 K_d 의 관계

- (3) 그림 1은 토양/용액 비율을 다양한 흡착량에 대해 K_d 값 함수를 나타낸다. 예를 들면, 토양/용액 비율이 1 : 5이고 K_d 값이 20인 경우, 약 80 %의 흡착이 발생한다. 같은 K_d 값으로 50 %의 흡착율을 얻기 위해서는, 1 : 25의 비율을 사용해야 한다. 적절한 토양/용액 비율을 선택하는 것은 시험 요구조건을 시험 수행인이 만족시킬 수 있는 적응성을 준다.

- (4) 처리하기가 가장 어려운 경우는 화학물질의 흡착량이 너무 적거나 너무 많은 경우이다. 흡착이 적게 일어나는 경우는, 현탁액을 얻기 위한 비율이 낮은 일부 유기질 토양을 감안하더라도, 토양/용액 비율을 1 : 1로 하는 것이 권장된다. 어떠한 경우라도, 용액 농도의 작은 변화를 측정할 수 있는 분석 방법을 선택해야 한다. 그렇지 않으면, 흡착 측정이 부정확할 수 있다. K_d 값이 매우 큰 경우는 토양흡착량을 고려하여 적정량의 시험물질을 용액에 남기기 위해 토양/용액 비율을 1 : 100까지 할 수 있다. 하지만 이 경우는 혼합에 주의해야 하며, 평형에 도달하기 위해 적절한 시간이 필요하다. 적당한 분석 방법이 없는 극단적인 흡착경향을 보이는 경우에는 P_{ow} 값(부록 4)을 기초로 한 평가 기법을 사용하여 K_d 값을 예측하는 방법이 대안으로 사용될 수 있다. 이 방법은 특히 P_{ow} 가 20 미만이며 낮은 흡착율을 가진 극성 화학물질과 P_{ow} 가 10^4 를 초과하는 친유성이며 흡착율이 높은 화학물질에 유용하다.

2.6 흡착시험

2.6.1 시험조건

- (1) 실험실 온도는 가능하면 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 사이의 일정한 온도를 유지한다.
- (2) 원심분리기는 용액에서 크기가 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 이상인 입자를 제거할 수 있는 조건을 갖춰야 한다. $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 은 최소 고체 입자에 대한 기준이며, 고체와 콜로이드 입자를 구분하는 경계이다. 원심분리기 조건은 부록 5를 참조한다.
- (3) 원심분리 장치로 입경 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 이상 입자를 제거할 수 없는 경우, 원심분리기와 $0.2\text{ }\mu\text{m}$ 필터를 갖춘 여과기를 함께 사용한다. 단 필터는 불활성 물질로 만들어져, 시험 물질에 손실이 없는 것을 사용한다. 또한 여과하는 동안 시험 물질의 손실이 없다는 것을 확인해야 한다.

2.6.2 1 단계 시험 : 예비 시험

2.6.2.1 최적 토양/용액 비율 선택

- (1) 두 종류 토양을 각각 3 종류의 토양/용액 비율로 맞추어 총 6 종류의 시험군을 시험한다. 사용되는 토양은 유기 탄소 함량이 높지만 점토 함량이 낮은 토양과 유기 탄소 함량이 낮지만 점토 함량이 높은 토양이다. 토양/용액 비율은 시험

시설에 따라 다를 수 있으며 일반적으로 아래와 같다.

- 토양 50 g + 수용액 50 cm³(비율 1 : 1)
- 토양 10 g + 수용액 50 cm³(비율 1 : 5)
- 토양 2 g + 수용액 50 cm³(비율 1 : 25)

(2) 시험에 사용하는 토양의 양은 시험실 시설과 분석 방법에 따라 다를 수 있다.

그러나 신뢰할 수 있는 결과를 얻기 위한 최소량은 1 g이며, 일반적으로 최소한 2 g 이상을 사용하는 것이 바람직하다.

(3) 시험 물질이 염화칼슘 용액에서 안정한지와 시험 용기 표면에 흡착되는지 여부를 확인하기 위해, 토양을 넣지 않고 시험물질만 첨가된 0.01 M 염화칼슘 용액을 1 개 만들어 대조군으로 사용한다. 대조군은 모든 시험 절차를 시료와 동일하게 처리한다.

(4) 시험물질을 넣지 않고 총 부피가 50 cm³인 0.01 M 염화칼슘 용액에 동일한 양의 토양을 넣은 공시료를 토양 당 1 개씩 만들어 모든 시험을 동일하게 처리한다. 이 시료는 시험과정에서 방해 물질이나 오염된 토양을 발견하기 위한 바탕시료로 사용한다.

(5) 대조군과 바탕시료를 포함한 모든 시험은 적어도 2 개 이상 만들어 실시한다.

(6) 기본적으로 예비 시험과 본시험은 같은 방법을 사용한다.

(7) 시험용 토양과 용액 사이에 평형상태가 되도록 0.01 M 염화칼슘 용액 45 cm³에 풍건토양시료를 넣은 후 12 시간 이상 미리 진탕시킨다. 진탕이 끝난 시료는 최종 부피를 50 cm³로 맞추기 위해, 시험 물질 저장표준용액을 일정량 첨가한다. 평형상태 전 용액의 특성이 변화되는 것을 가능한 최소화하려면, 첨가되는 표준용액의 부피는 액상 최종 부피인 50 cm³의 10 % 이내로 해야 한다. 또한 투입된 시험물질의 초기 농도(C₀)는 적어도 검출한계보다 100 배 이상 높아야 한다. 이렇게 시험물질의 초기농도를 설정하여야 시험 중 토양에 시험물질의 90 % 이상이 흡착되어도 정확한 측정을 할 수 있으며, 나중에 흡착 등온선을 결정할 수 있다. 또한 초기 물질 농도(C₀)는 용해도 한계의 50 %를 초과하지 않는 것이 바람직하다.

- 저장용액 농도(C_{st})의 농도 계산은 아래와 같이 한다 :

- 검출한계가 $0.01 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 이고, 흡착율을 90 %로 가정 할 경우, 투입되는 시험 물질의 초기 농도는 $1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 로 해야 한다.
- 투입되는 최대 표준용액 부피를 총 액상 부피 50 cm^3 의 10 %라고 가정하면, 5 cm^3 이므로 저장용액 농도는 $10 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 이 돼야 한다. 이 농도는 검출 한계보다 1,000 배 높은 값이다.

(8) 이온화 가능한 물질에서는 액상의 pH가 전체 흡착 과정에서 중요한 역할을 하기 때문에, 토양이 들어있는 시험용액에 시험물질을 넣기 전과 넣은 다음의 pH를 측정해야 한다.

(9) 흡착 평형상태에 도달할 때까지 혼합물을 진탕한다. 평형 시간은 화학물질과 토양의 종류에 따라 다르지만 일반적으로 24 시간이면 충분하다. 예비 시험에서는 4 시간, 8 시간, 24 시간, 48 시간으로 구분하여 시료를 채취할 수 있으나, 시험실 일정과 분석 시간을 고려해서 수행한다.

(10) 수용액에 함유된 시험 물질을 분석하는 방법은 아래와 같이 2 가지가 있으며, 시험 수행인이 상황에 맞는 방법을 선택한다. 병렬 방법이 직렬 방법보다 시험적으로 더 번거롭지만 결과를 수학적 처리하기에는 더 간단하다(부록 6).

- 병렬 방법 : 토양/용액 비율이 똑같은 시료를 흡착 열역학 계산에 필요한 시간 간격 수만큼 만든다. 예를 들어 원심분리 후 첫 번째 시료의 액상을 가능한 최대한 회수한 후 4 시간 뒤에 측정한다. 그리고 8시간 뒤에 두 번째 시료의 액상, 24 시간 후 세 번째 시료의 액상을 측정한다.

- 직렬 방법 : 토양/용액 비율이 같은 2 개의 시료를 만든 후, 상을 분리하기 위해 정해진 시간간격으로 원심분리를 한다. 원심분리가 끝난 시료는 상등액을 일부 분취해 분석을 하며, 나머지 부분을 가지고 시험을 계속한다. 토양/용액 비율에 높은 변화를 일으키지 않으며, 흡착에 필요한 용질의 질량을 감소시키지 않기 위해서는 분취한 총 부피가 용액 전체 부피의 1 %를 초과하면 안 된다.

(11) 흡착율 ' A_t '는 초기 명목 농도와 시료채취 시점(t_i)에서 측정한 농도를 바탕으로 계산한 후, 바탕 시험 값으로 보정을 한다. 평형이 안정한 상태에 도달한 것

을 추정하기 위해서, A_t 와 시간을 함수로 하는 그래프(그림 1, 부록 6)를 만든다. 경우에 따라서는 액상의 시험 물질 농도(C_{aq}^{ads})와 시간을 함수로 하는 그래프도 사용할 수 있다. 평형상태에서의 K_d 값도 계산한다. 이 K_d 값을 근거로, 흡착율이 최소 20 %이상이 되고 보통 50 %이상이 되도록 적절한 토양/용액 비율을 그림 1에서 선택한다. 적용 가능한 방정식과 그래프 작성 원리는 부록 6에 수록하였다.

2.6.2.2. 흡착을 위한 평형시간, 평형상태에서 흡착된 시험 물질의 양

(1) A_t 나 C_{aq}^{ads} 와 시간을 함수로 하는 그래프를 이용하여 흡착 평형상태 도달여부와 평형상태에서 흡착된 시험 물질의 양을 추정할 수 있다. 평형 시간은 시험계가 안정한 상태에 도달하는데 필요한 시간을 말한다.

(1) 어떤 토양에서 안정되는 시점이 없이 꾸준한 증가가 관측되는 경우는 생분해와 같은 복잡한 요인이나 느린 확산 속도가 그 원인이다. 생분해 현상은 살균한 토양 시료로 시험을 반복하면 확인할 수 있다. 이런 경우에도 정점에 도달하지 않으면, 시험조건(온도, 진탕 시간, 양/용액 비율)을 적절히 수정하면서, 다른 요인을 찾아봐야 한다. 평형상태에 도달하지 못한 경우, 시험을 다음단계로 계속 진행할지의 여부는 결정해야 한다.

2.6.2.3 시험 용기 표면 흡착여부 및 시험 물질의 안정도

(1) 시험 용기 표면에 대한 시험 물질의 흡착여부와 물질의 안정도에 관한 정보는 대조군 시료를 분석하여 얻는다. 분석 방법의 표준 오차보다 많은 손실이 생기는 것은 반응과정의 비생물학적 분해나 시험 용기 표면의 흡착에 의한 것이다. 일정량의 적절한 용매로 용기 벽을 깨끗이 세척한 후 세척한 용액에서 시험 물질을 분석하면, 이 두 현상의 차이를 알 수 있다. 시험 용기 표면에서 흡착이 관찰되지 않는 경우, 손실은 시험 물질의 비생물적 분해 때문에 생긴 것이다. 반면에 흡착이 관찰되는 경우에는 시험 용기 재질을 바꿔야 한다. 중요한 점은 이 시험으로 얻은 시험 용기 표면의 흡착에 관한 자료를 직접 외삽 하여 토양/용액 비율 시험에 적용하면 안 된다는 것이다. 이런 흡착현상은 토양이 있는 경우 일반적으로 줄어든다.

- (2) 시험 물질의 안정도에 관한 추가 정보는 시간 변화에 따른 전체 물질 수지를 결정하면 얻을 수 있다. 즉 액상, 토양, 용기 벽을 모두 분석하여 시험 물질의 양을 구한 다음 처음에 투입된 양과 비교한다. 첨가된 시험 화학물질의 질량과 분석에서 얻은 질량의 차이는 분해 또는 증발되었거나, 추출되지 않은 양이다. 물질 수지를 결정하려면 시험 기간 내에 흡착 평형상태에 도달해야 한다.
- (3) 물질 수지는 평형상태에서 토양 당 20 % 이상(개개는 50 % 이상) 소모가 되는 토양/용액 비율과 토양에 대해 결정된다. 48 시간 경과 후 마지막 시료를 원심분리와 여과를 통해 액상을 분리한 후 분석하면서 비율을 찾는 시험이 끝난다. 액상의 회수율은 가능한 높아야 하므로 최소한 추출상수가 95 % 이상인 적절한 추출 용매를 토양에 첨가하여 추출한다. 최소한 2 번 연속 추출하는 것이 권장된다. 토양과 시험 용기 추출물에 함유된 시험 물질의 양을 정량한 후 물질 수지를 계산한다(방정식 11 참조). 시험 물질의 회수율이 90 % 이하인 경우, 전체 시험 시간동안 시험 물질이 불안정한 것으로 간주한다. 하지만 시험 물질의 불안정성을 고려하면서 시험을 계속 진행할 수 있다. 이런 경우 본 시험에서는 모든 상에 대해 분석하는 것이 권장된다.

2.6.3 2 단계 시험 : 선별시험

2.6.3.1 주어진 농도에서 시험 물질의 흡착 열역학 계산

- (1) 표 1의 기준에 따라 선택한 5 개의 토양을 사용한다. 예비 연구에 사용된 토양의 일부 혹은 전체를 시험용 5 개 토양에 포함하면 유리하다. 예비 연구에서 시험이 끝난 토양에 대해서는 2 단계를 반복할 필요가 없다.
- (2) 예비 시험 결과를 바탕으로 평형 시간, 토양/용액 비율, 토양 시료의 무게, 토양과 접촉하는 액상의 부피, 용액에 함유된 시험 물질의 농도를 결정한다. 2 시간, 4 시간, 6 시간, 8 시간, 10 시간(가능할 경우 포함), 24 시간 진탕 후 분석하는 것이 좋다. 화학물질의 평형 시간이 길어지는 경우, 진탕 시간을 최대 48 시간까지 늘릴 수 있다. 하지만 분석 시간은 유연하게 고려한다.
- (3) 결과의 편차를 평가하기 위해 각 시험(1 개의 토양과 1 개의 용액)은 적어도 2 번 이상 실시하며 모든 시험은 1 개의 바탕 시험을 같이 한다. 바탕 시험군은 시험 물질을 함유하지 않고, 토양과 0.01 M 염화칼슘 용액으로만 이루어져 있는데,

바탕 시험군의 무게와 부피는 정상시험군과 똑같이 처리한다. 0.01 M 염화칼슘 용액의 시험 물질만 함유한 대조군 시료도 같은 절차로 시험한다.

- (4) 흡착율은 각 조사시점 A_{ti} 와 시간 간격 $A_{\Delta ti}$ 를 사용하여 계산하며, 시간을 함수로 하는 그래프로 나타낸다. 평형상태의 분배 계수 K_d 와 유기 탄소 표준 흡착 계수 K_{oc} 도 계산한다.

2.6.3.2 계산된 흡착 열역학 시험 결과 검토

- (1) 토양의 흡착 행동을 설명하는 선형 K_d 값은 일반적으로 정확하므로, 토양에 함유된 화학물질의 고유한 이동성을 표현한다. 예를 들어 K_d 값이 $1\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ 이하인 일반 화학물질은 정성적으로 이동하는 것으로 여겨진다. 또한 K_{oc} 값과 DT-50의 관계를 근거한 침출 분류기준과 K_{oc} 값을 바탕으로 한 이동성 분류기준도 있다.
- (2) 가장 좋은 토양/용액 비율인 1 : 1을 사용하는 경우에도, 액상의 농도가 감소하면 $0.3\text{cm}^3\text{g}^{-1}$ 이하의 K_d 값은 정확하게 추정할 수 없다. 이런 경우에는 토양상과 용액을 모두 분석해야 한다.
- (3) 정확한 K_d 값을 얻을 수 있으면 Freundlich 흡착 등온식을 사용하여 토양에서 시험물질의 흡착성과 이동성을 계산한다. 간접법을 사용하여 K_d 값과 토양/용액 비율을 곱한 값이 0.3을 초과하거나, 직접법을 사용하여 K_d 값과 토양/용액 비율을 곱한 값이 0.1을 초과하면 정확한 값을 결정할 수 있다.

2.6.4 3 단계 시험 : 흡착 및 탈착 등온방정식 결정시험

2.6.4.1 흡착등온선

- (1) 100 배 범위 안에서 5 개의 시험 물질 농도를 사용한다. 농도의 선택은 물 용해도와 시험에서 수용액에 남을 평형 농도를 고려해야 한다. 시험하는 동안에는 각 토양별로 시험 토양/용액 비율을 유지해야 한다. 흡착 시험은 1 단계 시험에서 흡착량을 구하는 방법과 동일하며, 다른 점은 2 단계 시험에서 결정된 평형단계에 도달하였을 때 액상을 단 한번 분석한다는 것이다. 평형상태의 액상농도를 결정하며, 흡착되는 양은 용액 상에서 시험물질이 감소한 양을 이용해 계산하거나, 직접 방법으로 계산한다. 토양의 단위 용량 당 흡착된 양은 시험물질의 평형 농도 함수로 나타낸다.

- (2) 이제까지 제안된 수학적 흡착 모델 중, 흡착 과정을 설명하는데 Freundlich 등온선이 가장 널리 사용된다. 단 Freundlich 흡착 계수(K_F) 값은 같은 단위로 표시되는 경우에만, 다른 물질에 대한 K_F 값과 비교가 가능하다.

2.6.4.2 탈착 열역학

- (1) 이 시험의 목적은 화학물질이 가역적으로 혹은 비가역적으로 토양에 흡착되는지를 조사하기 위한 것이다. 탈착 과정도 토양에 함유된 화학물질의 거동에 중요한 역할을 하기 때문에, 이 정보는 중요하다. 또한 탈착 자료는 컴퓨터에 입력해, 침출 및 용출에 대한 모의시험에 사용된다. 탈착 시험이 필요할 경우 정확한 K_d 값을 결정하여야 한다.
- (2) 시험방법은 흡착 열역학 시험과 같이 병렬 방법과 직렬 방법 2 가지가 있으며, 시험 수행인이 상황에 맞게 선택한다.
- (3) 병렬 방법 : 탈착 시험을 위해 선택한 각 토양에 대해, 탈착 열역학 시험에 필요한 시간 간격 수만큼, 같은 토양/용액 비율로 시료를 만든다. 대개는 흡착 열역학 시험과 같은 시간 간격을 사용하지만, 완전한 탈착 평형 도달을 위하여 총 시간을 적절하게 늘릴 수 있다. 모든 시험(1 개의 토양과 1 개의 용액)에 1 개의 바탕 시험군을 같이 한다. 바탕 시험군은 시험 물질을 함유하지 않고, 토양과 0.01 M 염화칼슘 용액으로만 이루어져 있는데, 바탕 시험군의 무게와 부피는 정상시험군과 똑같이 처리한다. 0.01 M 염화칼슘 용액의 시험 물질만 함유한 대조군 시료도 같은 절차로 시험한다. 2 단계 시험에서 언급한 방법과 같게 흡착 평형에 도달할 때까지, 용액과 토양 혼합물을 진탕한다. 진탕이 끝나면 원심분리기로 상을 분리하며, 이때 액상을 가능한 한 많이 제거한다. 제거된 용액의 양 만큼 시험 물질을 함유하지 않은 0.01 M 염화칼슘 용액을 넣은 후 새로운 혼합물을 다시 진탕한다. 예를 들자면 2 시간이 경과한 후 첫 번째 시료의 액상을 가능한 한 완벽하게 회수하여 측정한다. 2 번째 시료는 4 시간 후, 3 번째 시료는 6 시간 후 각각 회수하여 측정하며, 탈착 평형이 될 때까지 계속한다.
- (4) 직렬 방법 : 흡착 열역학 시험을 한 후, 혼합물은 원심분리를 통해 액상을 가능한 한 많이 제거한다. 제거된 용액의 양 만큼 시험 물질을 함유하지 않은 0.01

M 염화칼슘 용액을 넣은 후 새로운 혼합물을 다시 평형에 이를 때까지 진탕한다. 상을 분리하기 위해 정해진 시간간격으로 원심분리를 한다. 원심분리가 끝난 시료는 상등액을 일부 분취해 분석을 하며, 나머지 부분을 가지고 시험을 계속한다. 토양/용액 비율에 높은 변화를 일으키지 않으며, 흡착에 필요한 용질의 질량을 감소시키지 않기 위해서는 분취한 총 부피가 용액 전체 부피의 1 %를 초과하면 안 된다. 토양/용액 비율을 일정하게 유지하기 위해, 분취한 양과 같은 양의 0.01 M 염화칼슘 용액을 혼합물에 첨가하고, 다음 시간 간격 때까지 계속 진탕한다.

- (5) 탈착율은 각 조사시점 D_{ti} 와 시간 간격 $D_{\Delta ti}$ 를 사용하여 계산하며, 시간을 함수로 하는 그래프로 나타낸다. 평형상태의 탈착계수 K_{des} 도 계산한다.
- (6) 탈착율 D_{ti} 및 흡착율 A_{ti} 를 시간과 함수로 하는 그래프로 흡착 과정의 가역성을 추정할 수 있다. 만일 탈착 평형에 도달하는 시간이 흡착 평형 시간의 2 배이며, 탈착된 양이 흡착된 양의 75 % 이상인 경우, 이 흡착은 가역적인 것으로 간주된다.

2.6.4.3 탈착 등온선

- (1) Freundlich 탈착 등온선은 흡착 등온선 시험에서 사용한 토양에 대해 결정한다. 탈착시험은 탈착 열역학 시험방법과 동일하며 다른 점은 탈착평형단계에 도달하였을 때 액상을 단 한번 분석한다는 것이다. 그런 다음 탈착된 시험 물질의 양을 계산한다. 탈착 평형상태에서 토양에 흡착된 채로 남아있는 시험 물질의 양은 용액에 함유된 시험물질의 평형 농도에 대한 함수로 나타낸다(부록 6).

III. 시험결과 계산

분석 결과는 표로 정리된다(부록 7 참조). 표에서는 개별 측정값과 평균값이 제공되며, 흡착 등온선은 그래프로 나타낸다. 계산은 아래의 방식을 따른다. 시험 목적을 위해, 수용액 1 cm³의 무게를 1 g로 간주한다. 토양/용액 비율 단위는 w/w 또는 w/vol 로 나타낸다.

1. 흡착

1.1 시험 물질이 안정하고, 많은 양이 용기에 흡착되지 않은 경우 다음 방정식에 따라 각 시점 t_i 에서 흡착율 A_{ti} 값을 계산한다.

$$A_{t_i} = \frac{m_s^{ads} \cdot 100}{m_0} (\%) \quad (4)$$

여기서,

A_{ti} = 임의시점 t_i 에서 흡착율 (%)

$m_s^{ads}(t_i)$ = 시점 t_i 에서 토양에 흡착되는 시험 물질의 질량 (μg)

m_0 = 시험 초기에 시험관에 있는 시험 물질의 질량 (μg)

1.2 분배 계수 K_d 는 다음의 식으로 계산한다.

$$K_d = \frac{C_s^{ads}(eq)}{C_{aq}^{ads}(eq)} = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{aq}^{ads}(eq)} \frac{V_0}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (5)$$

여기서,

$C_s^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 토양에 흡착된 물질의 함량($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

$C_{aq}^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 액상에 함유된 물질의 질량 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$) : 이 농도는 바탕 시험군으로 얻은 값을 고려해, 분석으로 결정한다.

$m_s^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 토양에 흡착된 시험 물질의 질량(μg)

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 용액에 함유된 시험 물질의 질량(μg)

m_{soil} = 건조 질량기준의 토양 상의 양(g)

V_0 = 토양과 접촉하는 액상의 초기 부피(cm^3)

1.3 A_{eq} 와 K_d 의 관계는 다음 식으로 주어진다.

$$K_d = \frac{A_{eq}}{100 - A_{eq}} \cdot \frac{V_0}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (6)$$

여기서,

A_{eq} = 흡착 평형상태에서 흡착율(%)

- 1.4 유기 탄소 표준 흡착 계수 K_{oc} 는 분배 계수 K_d 와 토양 시료의 유기 탄소 함량과 관련 있다.

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%_{oc}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (7)$$

여기서,

$\%_{oc}$ = 토양 시료에 함유된 유기 탄소 $\%(\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$

K_{oc} 는 주로 토양이나 퇴적물에 함유된 유기 탄소와 물 사이에서 주로 비극성 유기 화합물질의 분배 특정을 나타내는 대표적인 값이다. 화합물의 흡착은 흡착하는 고체의 유기물 함량과 관련이 있는데, 유기물의 상당 부분을 차지하는 부식성분은 유래와 기원이 달라 흡착용량이 다르다. 이러한 부식성분의 특성에 따라 K_{oc} 값도 달라진다.

2. 흡착 등온선

- 2.1 Freundlich 흡착 등온선 방정식은 평형상태에서 흡착된 시험 물질의 양과 용액 속에 함유된 시험 물질의 농도의 함수이다. 분석 값은 흡착 계산과 같은 방법으로 처리하며, 각 시험관에서 흡착 시험 후 토양에 흡착된 시험 물질의 함량 $[C_s^{ads}(eq)]$, 그밖에는 x/m 으로 표시됨]을 계산한다. 평형을 얻었다고 가정하고, $C_s^{ads}(eq)$ 를 평형 값으로 표시한다.

$$C_s^{ads}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq)}{m_{soil}} = \frac{[C_0 - C_{aq}^{ads}(eq)] \cdot V_0}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (8)$$

- 2.1 Freundlich 흡착 방정식은 식 (9)와 같으며, 선형으로 나타내면 식(10)과 같다.

$$C_s^{ads}(eq) = K_F^{ads} \cdot C_{aq}^{ads}(eq)^{\frac{1}{n}} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (9)$$

$$\log C_s^{ads}(eq) = \log K_F^{ads} + \frac{1}{n} \cdot \log C_{aq}^{ads}(eq) \quad (10)$$

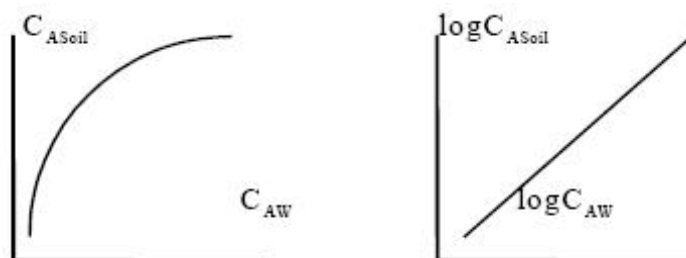
여기서,

K_F^{ads} = Freundlich 흡착 계수 ; $1/n = 1$ 인 경우 단위는 $\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$ 이며, 다른 모든 경우에는 K_F^{ads} 단위 $[\mu\text{g}^{[1-(1/n)]}(\text{cm}^3)^{1/n}\text{g}^{-1}]$ 에서 기울기 $1/n$ 을 따로 나타낸다.

n = 회귀 상수 ; $1/n$ 범위는 일반적으로 $0.7 \sim 1.0$ 사이이며, 이것은 흡착자료가 약간 비선형이라는 것을 의미한다.

식 (9)와 (10)은 그래프로 나타낼 수 있으며, K_F^{ads} 값과 $1/n$ 값은 식 (10)을 사용하여 회귀 분석으로 계산한다. \log 방정식의 상관 계수 r^2 도 계산한다. 그림 2는 Freundlich 흡착 정규 곡선 및 선형 그림의 예이다.

그림 2 Freundlich 흡착 정규 곡선 및 선형 그림



3. 물질 수지

3.1 흡착에 대한 물질 수지는 식 (11)과 같이 계산한다. m_E 는 토양과 시험 용기 표면에서 유기 용매로 추출한 시험 화학물질 질량의 합에 해당한다.

$$MB = \frac{(V_{rec} \cdot C_{aq}^{ads}(eq) + m_E) \cdot 100}{V_0 \cdot C_0} \quad (\%) \quad (11)$$

여기서,

MB = 물질 수지 (%)

m_E = 2 단계로 토양과 시험 용기 벽에서 추출한 시험 물질의 총 질량 (μg)

C_0 = 토양과 접촉하는 시험 용액의 초기 질량 농도 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

V_{rec} = 흡착 평형 후, 회수된 상등액의 부피 (cm^3)

3.2 용매가 물과 완전히 혼합되는 경우, 데이터 처리를 다르게 해야 한다. 이런 용매를 사용했을 경우 용매 추출로 회수된 물질의 양을 결정할 때 탈착시험에 있는 방법을 적용할 수 있다. 용매가 물과 혼합이 잘 안 되는 경우에는 회수된 양을 확인해야 한다.

4. 탈착

4.1 탈착율은 아래의 식 (12)를 이용하여 계산한다. 병렬 및 직렬 방법에 사용되는 탈착율 D_{ti} 계산에 관한 상세한 정보는 부록 6에 수록하였다.

$$D_{t_i} = \frac{m_{aq}^{des}(t_i)}{m_s^{ads}(eq)} \cdot 100 \quad (\%) \quad (12)$$

여기서,

D_{ti} = 일정 시점 t_i 에서 탈착율(%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = 일정 시점 t_i 에서 토양에서 탈착된 시험 물질의 질량(μg)

$m_s^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 토양에 흡착된 시험 물질의 질량(μg)

4.2 평형 탈착 계수 K_{des} 는 아래의 식 (13)을 이용하여 계산한다. 탈착된 물질의 총량($m_{aq}^{des}(eq)$)의 계산에 대한 세부내용은 부록 6의 탈착 부분에 수록하였다. 탈착 시험에 앞서 흡착시험을 병렬 방법으로 실행하는 경우, 식 (13)의 부피 V_T 는 V_0 와 같다고 간주한다.

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{aq}^{des}(eq)} \frac{Y_T}{m_{soil}} \quad (\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}) \quad (13)$$

여기서,

$$K_{des} = \text{탈착 계수}(\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1})$$

$$m_{aq}^{des}(eq) = \text{탈착 평형에서 토양에서 탈착된 시험 물질의 총 질량}(\mu\text{g})$$

$$V_T = \text{탈착 열역학 시험을 하는 동안 토양과 접촉하는 액상의 총 부피}(\text{cm}^3)$$

5. 탈착 등온선

5.1 각 시험관에서 탈착 평형단계에 토양에 흡착된 후 남아있는 물질의 함량은 아래의 식 (14)와 같이 계산한다. 식 (14)에서 사용되는 $m_{aq}^{des}(eq)$ 는 식 (15)와 같이 정의된다.

$$C_s^{des}(eq) = \frac{m_s^{ads}(eq) - m_{aq}^{des}(eq)}{m_{soil}} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (14)$$

$$m_{aq}^{des}(eq) = m_m^{des}(eq) \cdot \frac{V_0}{V_r^F} - m_{aq}^A \quad (\mu\text{g}) \quad (15)$$

여기서,

$$C_s^{des}(eq) = \text{탈착 평형에서 토양에 흡착된 후 남아있는 시험 물질의 함량}(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$$

$$m_m^{des}(eq) = \text{탈착 평형에서 액상에서 분석으로 결정한 물질의 질량}(\mu\text{g})$$

$$m_{aq}^A = \text{불완전한 부피 교체 때문에, 흡착 평형에서 남은 시험 물질의 질량}(\mu\text{g})$$

$$m_{aq}^{ads}(eq) = \text{흡착 평형에서 용액 속에 함유된 물질의 질량}(\mu\text{g})$$

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq) \cdot [(V_0 - V_R)/V_0] \quad (16)$$

$$V_r^F = \text{탈착 평형에서 시험 물질의 측정을 위해 시험관에서 취한 용액의 부피}(\text{cm}^3)$$

$$V_R = \text{흡착 평형을 얻은 후 시험관에서 제거한 후, 같은 부피의 0.01 M 염화칼슘 용액으로 교체한 상등액의 부피}(\text{cm}^3)$$

5.2 Freundlich 탈착 등온선 방정식은 식 (17)과 같으며 선형으로 나타내면 식(18)과 같다.

$$C_s^{des}(eq) = K_F^{des} \cdot C_{aq}^{des}(eq)^{1/n} \quad (\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) \quad (17)$$

$$\log C_s^{des}(eq) = \log K_F^{des} + 1/n \cdot \log C_{aq}^{des}(eq) \quad (18)$$

여기서,

K_F^{des} = Freundlich 탈착 계수

n = 회귀 상수

$C_{aq}^{des}(eq)$ = 탈착 평형에서 액상 물질의 질량 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

식 (17)과 (18)은 그래프로 나타낼 수 있으며, K_F^{des} 값과 $1/n$ 값은 식 (18)을 사용하여 회귀 분석으로 계산한다. Freundlich 흡착 또는 탈착의 log 지수 ($1/n$) 값이 1인 경우, Freundlich 흡착 또는 탈착 결합 상수(K_F^{ads} 와 K_F^{des})는 각각 흡착, 탈착 평형상수(K_d 와 K_{des})와 같으며, C_s 와 C_{aq} 를 함수로 하는 그래프를 그리면, 직선이 된다. log 지수가 1이 아닌 경우, C_s 와 C_{aq} 를 함수로 하는 그래프를 그리면, 직선이 되지 않아, 흡착 및 탈착 상수가 등온선에 따라 변한다.

IV. 시험결과의 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4 토양 시료에 대한 정보

- (1) 시료채취 지역의 지리학적 정보(위도, 경도)
- (2) 채취 날짜
- (3) 토양의 용도(즉, 농업용 토양, 숲, 등)
- (4) 채취 깊이
- (5) 토성 (모래, 미사, 점토 함량)

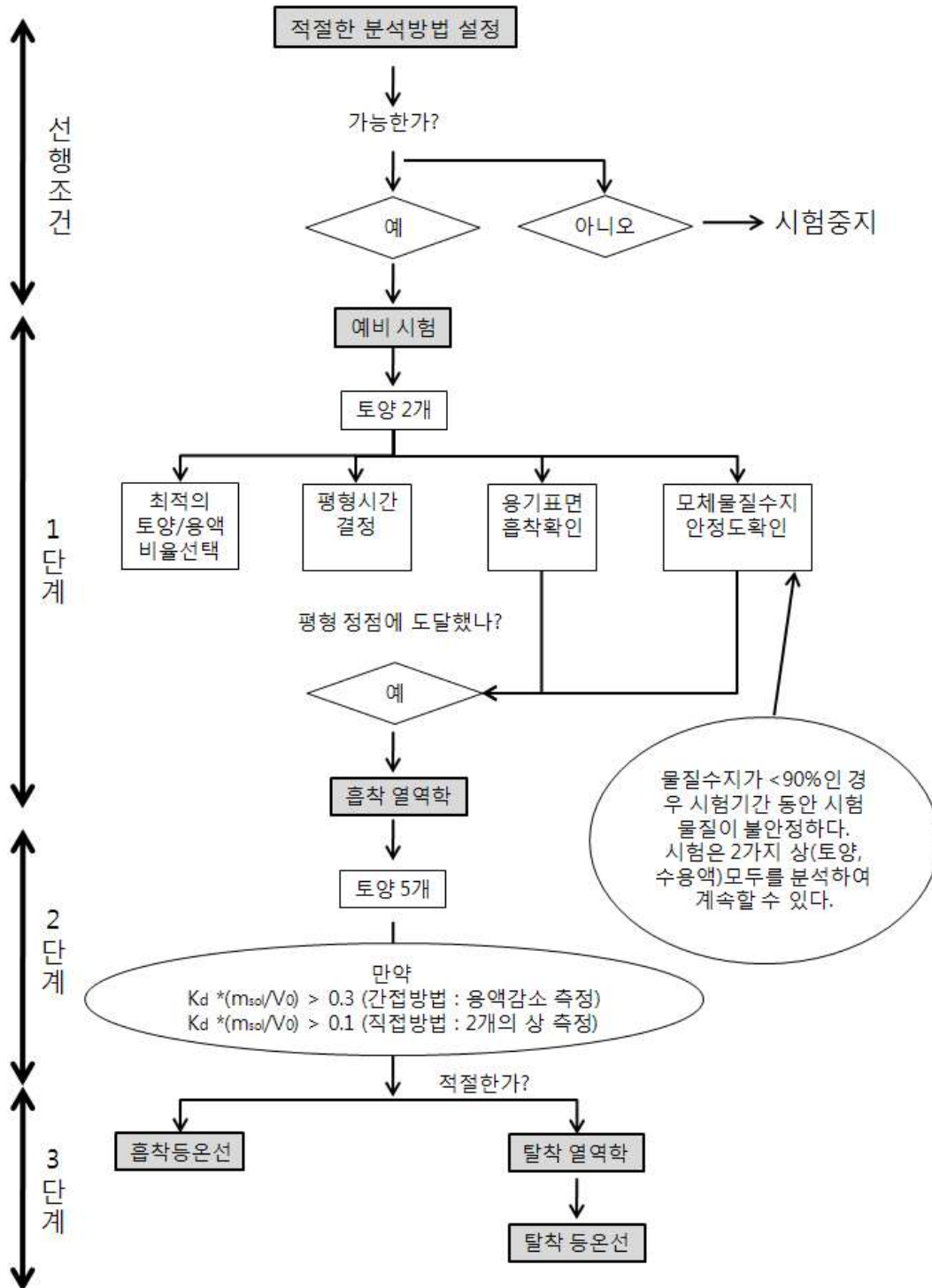
2.5 시험조건

- (1) 시험용 토양 : pH 값(0.01 M 염화칼슘 용액에서), 유기 탄소 함량, 유기 물질 함량, 질소 함량, C/N 비율, 양이온 치환 용량(mmol/kg), 토양 시료의 수집 및 저장과 관련된 모든 정보
- (2) 기타정보. 가능하다면, 시험 물질의 흡착/탈착에 대한 해석과 관련 있는 모든 정보
- (3) 각 매개변수를 결정할 때 사용한 참고 방법
- (4) 적절한 시험 물질에 관한 정보
- (5) 시험 온도
- (6) 원심분리 조건
- (7) 시험 물질을 분석하기 위해 사용한 분석 절차
- (8) 시험 물질 표준 용액 조제를 위해 사용한 모든 용매의 타당성

2.6 시험결과

- (1) 계산에 적용한 수정사항에 대한 설명
- (2) 양식(부록 7) 및 그래프에 따른 데이터
- (3) 시험 결과를 해석할 때 도움이 될 수 있는 모든 정보 및 관찰

부록 1. 시험 계획



부록 2. 정의 및 단위

기호	정의	단위
A_{ti}	시간 포인트 t_i 에서 흡착율	%
A_{eq}	흡착 평형에서 흡착율	%
$m_{s}^{ads}(t_i)$	시간 포인트 t_i 에서 토양에 흡착되는 시험 물질의 질량	μg
$m_{s}^{ads}(\Delta t_i)$	시간 간격 Δt_i 동안 토양에 흡착된 시험 물질의 질량	μg
$m_{s}^{ads}(eq)$	흡착 평형에서 토양에 흡착된 시험 물질의 질량	μg
m_0	시험 초기에 시험 시험관 속의 존재하는 시험 물질의 질량	μg
$m_m^{ads}(t_i)$	시간 포인트 t_i 에서 분할 검액(v_a^A)으로 측정된 물질의 질량	μg
$m_{aq}^{ads}(eq)$	흡착 평형에서 용액에 함유된 시험 물질의 질량	μg
m_{soil}	토양의 건조 질량으로 표시된 토양 상의 양	g
C_{st}	시험 물질 표준용액의 질량 농도	$\mu g \cdot cm^{-3}$
C_0	토양과 접촉하는 시험 용액의 초기 질량 농도	$\mu g \cdot cm^{-3}$
$C_{aq}^{ads}(t_i)$	분석이 실행되는 시간 t_i 에서 액상 물질의 질량 농도	$\mu g \cdot cm^{-3}$
$C_s^{ads}(eq)$	흡착 평형에서 토양에 흡착된 물질의 함량	$\mu g \cdot g^{-1}$
$C_{aq}^{ads}(eq)$	흡착 평형에서 액상에 함유된 물질의 질량 농도	$\mu g \cdot cm^{-3}$
V_0	토양과 접촉하는 액상의 초기 부피	cm^3
v_a^A	시험 물질을 측정하는 분할 검액의 부피	cm^3
K_d	흡착 분배 계수	$cm^3 \cdot g^{-1}$
K_{oc}	유기 탄소 표준 흡착 계수	$cm^3 \cdot g^{-1}$
K_{om}	유기 물질 표준 분배 계수	$cm^3 \cdot g^{-1}$
K_F^{ads}	Freundlich 흡착 계수	$\mu g^{[1-(1/n)]} (cm^3)^{(1/n)} g^{-1}$
$1/n$	Freundlich 지수	
D_{ti}	시간 포인트 t_i 에서 탈착율	%
$D_{\Delta ti}$	시간 간격 Δt_i 에 해당하는 탈착율	%
K_{des}	평형 탈착 계수	$cm^3 \cdot g^{-1}$
K_F^{des}	$K_F^{des} =$ Freundlich 탈착 계수	$\mu g^{[1-(1/n)]} (cm^3)^{(1/n)} g^{-1}$
$m_{aq}^{des}(t_i)$	시간 포인트 t_i 에서 토양에서 탈착된 시험 물질의 질량	μg
$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	시간 Δt_i 동안 토양에서 탈착된 시험 물질의 질량	μg
$m_m^{des}(eq)$	탈착 평형에서 액상에서 분석으로 결정한 물질의 질량	μg

$m_{aq}^{des}(eq)$	탈착 평형에서 토양에서 탈착된 시험 물질의 총 질량	μg
$m_s^{des}(\Delta t_i)$	시간 간격 Δt_i 후 토양에 흡착된 뒤 남아있는 물질의 질량	μg
m_{aq}^A	불완전한 부피 교체 때문에, 흡착 평형에서 남은 시험 물질의 질량	μg
$C_s^{des}(eq)$	탈착 평형에서 토양에 흡착된 후 남아있는 시험 물질의 함량	$\mu g \cdot g^{-1}$
$C_{aq}^{des}(eq)$	탈착 평형에서 액상 물질의 질량 농도	$\mu g \cdot cm^{-3}$
V_T	직렬 방법으로 실행하는 탈착 열역학 시험을 하는 동안 토양과 접촉하는 액상의 총 부피	cm^3
V_R	흡착 평형을 얻은 후 시험관에서 제거한 후, 같은 부피의 0.01M 염화칼슘 용액으로 교체한 상등액의 부피	cm^3
V_a^D	직렬 방법으로 실행하는 흡착 열역학 시험을 하는 시간 (i) 동안, 분석 목적으로 시료채취 한 분할 검액의 부피	cm^3
V_r^i	탈착 열역학 시험에서(병렬 방법), 시험 물질 측정을 위한 시험관에서 취한 용액의 부피	cm^3
V_r^F	탈착 평형에서 시험 물질의 측정을 위해 시험관에서 취한 용액의 부피	cm^3
MB	물질 수지	%
m_E	2단계로 토양과 시험 용기 벽에서 추출한 시험 물질의 총 질량	μg
V_{rec}	흡착 평형 후, 복원된 상등액의 부피	cm^3
P_{ow}	옥탄올/물 분배 계수	
pKa	해리 상수	
S_w	물 용해도	$g \cdot l^{-1}$

부록 3. 흡착 결과의 정확도에 대한 분석 방법의 정확도 및 농도 변화의 영향

다음 표를 보면, 초기 질량($m_0 = 110 \mu\text{g}$)과 용액에 함유된 시험 물질의 평형 농도 $[m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq}) = 100 \mu\text{g}]$ 의 차가 매우 작아, 평형 농도 측정 에러가 5 %인 경우, 토양에 흡착된 물질의 질량 $[m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})]$ 계산 에러는 50 %이고, K_d 값 계산 에러는 52.4 %인 것을 알 수 있다.

토양의 양 $m_{\text{soil}} = 10 \text{ g}$

용액의 부피 $V_0 = 10 \text{ cm}^3$

	$m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$ (μg)	$C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$)	R	$m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})^*$ (μg)	$C^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})$ ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	R^\ddagger	K_d^*	R^\ddagger
$m_0 = 110 \mu\text{g}$ 혹은 $C_0 = 1.100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$	A = 9 %							
	100	1.000	실제 값	10	1.00	실제 값	1	
	101	1.010	1 %	9	0.90	10 %	0.891	10.9 %
	105	1.050	5 %	5	0.50	50 %	0.476	52.4 %
	109	1.090	9 %	1	0.10	90 %	0.092	90.8 %
	A = 55 %							
	50.0	0.500	실제 값	60.0	6.00	실제 값	12.00	
	50.5	0.505	1 %	59.5	5.95	0.8 %	11.78	1.8 %
	52.5	0.525	5 %	57.5	5.75	4.0 %	10.95	8.8 %
	55.0	0.550	10 %	55.0	5.50	8.3 %	10.00	16.7 %
	A = 99 %							
	1.100	0.011	실제 값	108.9	10.89	실제 값	990	
	1.111	0.01111	1 %	108.889	10.88	0.01 %	980	1.0 %
	1.155	0.01155	5 %	108.845	10.8845	0.05 %	942	4.8 %
	1.21	0.0121	10 %	108.790	10.8790	0.10 %	899	9.2 %

$$m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq}) = m_0 - m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$$

$$C^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq}) = [C_0 - C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})]V_0/m_{\text{soil}}$$

$$K_d = [m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})/m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})]V_0/m_{\text{soil}}$$

$m^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})$ = 평형에서 토양 상에 함유된 시험 물질의 질량(μg)

$m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$ = 평형에서 액상 시험 물질의 질량(μg)

$C^{\text{ads}}_{\text{s}}(\text{eq})$ = 평형에서 토양 상에 함유된 시험 물질의 함량($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

$C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$ = 평형에서 액상 시험 물질의 질량 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

$R = m^{\text{ads}}_{\text{aq}}(\text{eq})$ 를 결정할 때 분석 에러

R^\ddagger = 분석 에러 R 때문에 계산된 에러

부록 4. K_d 값 추정 기술

- 추정 기술로 P_{ow} 값(12, 39, 63 ~ 68), 물 용해도 데이터(12, 19, 21, 39, 68 ~ 73), 혹은 역상 HPLC(74 ~ 76)를 이용해 얻은 극성 데이터와의 상호 관계를 근거해, K_d 값을 예측할 수 있다. 표 1 및 2에서 볼 수 있는 값은 아래의 방정식으로 계산한 K_{oc} 값 혹은 K_{om} 값과, 그리고 간접적으로 이 방정식을 이용해 계산한 K_d 값이다.

$$K_{oc} = K_d \cdot 100/\%_{oc} \text{ (cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}\text{)}$$

$$K_{om} = (K_d/1.724)(100/\%_{oc}) \text{ (cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}\text{)}$$

- 이 상호 관계의 개념은 다음 2 개의 가정에 근거한다.
 - 2.1 물질의 흡착에 영향을 주는 것은 주로 토양의 유기 물질이다.
 - 2.2 관련 있는 상호 관계는 주로 비극성이다.
 - 2.3 결과적으로, 상호 관계 2.1은 극성 물질에 적용할 수 없거나, 어느 정도만 적용할 수 있다. 토양의 유기 물질 함량이 매우 작은 경우, 상호 관계 2.2는 적용할 수 없다(12). 또한 P_{ow} 와 흡착 사이에 만족스러운 상호 관계를 관찰했다할지라도, 물 용해도와 흡착 정도 사이의 상호 관계와 같은 정도는 될 수 없다(19, 21). 이제까지의 연구는 모순이 많다.
- 흡착 분배 계수와 옥탄올-물 분배 계수의 상호 관계에 대한 일부의 예와, 흡착 분배 계수와 물 용해도의 상호 관계에 대한 일부의 예가 표 1 및 2에 각각 주어진다.

표 1 흡착 분배 계수와 옥탄올-물 분배 계수의 상호 관계에 대한 예.

화합물	상호 관계	작자
치환 요소	$K_{om} = 0.69 + 0.52 \cdot \log P_{ow}$	Briggs (1981) (Ref. 39)
방향족 염소 화합물	$K_{oc} = -0.779 + 0.904 \cdot \log P_{ow}$	Chiou <i>et al.</i> (1983) (Ref. 65)
다양한 살충제	$\log K_{om} = 4.4 + 0.72 \cdot \log P_{ow}$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (Ref. 66)
방향족 탄화수소	$K_{oc} = -2.53 + 1.15 \cdot \log P_{ow}$	Vowles and Mantoura (1987) (Ref. 67)

표 2 흡착 분배 계수와 물 용해도의 상호 관계에 대한 예.

화합물	상호 관계	작자
다양한 살충제	$\log K_{om} = 3.8 - 0.561 \cdot \log S_w$	Gerstl and Mingelgrin (1984) (Ref. 66)
지방족/방향족 염소 물질	$K_{om} = (4.040 \pm 0.038) - (0.557 \pm 0.012) \cdot \log S_w$	Chiou <i>et al.</i> (1979) (Ref. 70)
a-naphthol	$\log K_{oc} = 4.273 - 0.0686 \cdot \log S_w$	Hasset <i>et al.</i> (1981) (Ref. 71)
지방족/방향족 고리 물질	$\log K_{oc} = -1.405 - 0.921 \cdot \log S_w - 0.00953(mp - 25)$	Karickhoff (1981) (Ref. 72)
다양한 화합물	$K_{oc} = 2.75 - 0.45 \cdot \log S_w$	Moreale van Blade (1982) (Ref. 73)

OECD 시험 지침서 초안 “HPLC를 사용한 토양 및 하수 찌꺼기에 대한 흡착 계수(K_{oc}) 추정”, 1997년 7월

부록 5. 원심분리 조건을 규정하기 위한 계산

1. 원심분리 시간은 구형 입자라는 가정 하에, 다음 식과 같이 주어진다.

$$t = (9/2)[\eta/\omega^2 r_p^2(\rho_s - \rho_{aq})]\ln (R_b/R_t) \quad (1)$$

식을 간략하게 만들기 위해, 모든 매개변수는 SI 단위가 아니다(g, cm).

여기서,

$$\omega = \text{회전 속도}(2\pi \cdot \text{rpm}/60)(\text{rad} \cdot \text{s}^{-1})$$

$$\text{rpm} = \text{분당 회전수}$$

$$\eta = \text{용액의 점도}(\text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1})$$

$$r_p = \text{입자의 반경}(\text{cm})$$

$$\rho_s = \text{고체의 밀도}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$$

$$\rho_{aq} = \text{용액의 밀도}(\text{g} \cdot \text{cm}^{-3})$$

$$R_t = \text{원심분리기 회전자부터 원심분리기 시험관 속 용액의 위까지의 거리}(\text{cm})$$

$$R_b = \text{원심분리기 회전자부터 원심분리기 시험관 바닥까지의 거리}(\text{cm})$$

$$R_b - R_t = \text{원심분리기 시험관 속 토양/용액 혼합물의 길이}(\text{cm})$$

완전한 분리를 위해, 일반적으로 계산 값의 2 배를 사용한다.

2. 용액의 점도(η)와 밀도(ρ_{aq})를 25 °C에서 물의 점도와 밀도와 같게 고려하는 경우, 방정식 (1)을 더 간략하게 만들 수 있다. 그러므로 $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 이고, $\rho_{aq} = 1.0 \text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 이다.

그리고 원심분리 시간은 방정식 (2)로 주어진다.

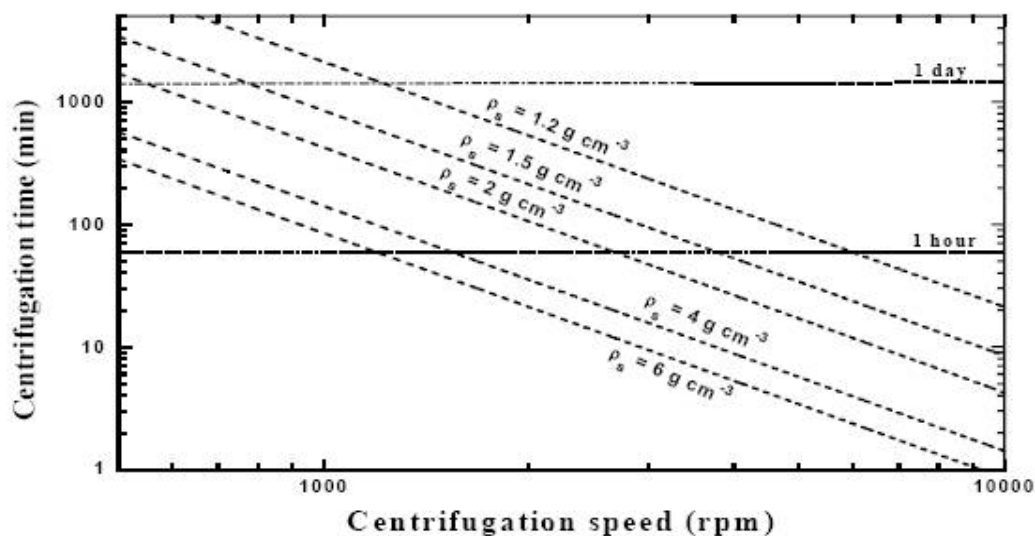
$$t = \{3.7/[(\text{rpm})^2 \cdot r_p^2(\rho_s - 1)]\}\ln (R_b/R_t) \quad (2)$$

3. 방정식 (2)를 보면, 원심분리 조건, 즉 특정 크기(여기선 0.1 μm 의 반경)를 가진 입자를 분리시키기 위한 시간(t)과 속도(rpm)를 규정할 때, 2 개의 매개변수가 중요하다는 것이 확실하다. 2 개의 매개변수는 토양의 밀도와 원심분리기 시험관($R_b - R_t$) 속 혼합물의 길이, 즉 용액의 위부터 시험관의 바닥까지 토양 입자가 커버하는 거리다. 정해진 부피에 대해, 시험관 반경의 제공에 따라, 시험관 속 혼합물의 길이는 다르다.

4. 그림 1은 다른 토양 밀도(ρ_s)(그림 1a)와 원심분리기 시험관 속 혼합물의 다른 길이(그림 2a)에 대해, 원심분리 시간(t)/원심분리 속도(rpm)의 변화를 나타낸다. 그림 1a에서, 고체 밀도의 영향이 분명한 것처럼 보인다. 예로, 전형적인 원심분리 속도 3,000 rpm에서, 고체 밀도 $1.2 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 에 대해, 원심분리 시간은 약 240 분이지만, 고체 밀도 $2.0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$ 에 대해서는 원심분리 시간이 50 분밖에 안 된다. 유사한 방법으로 그림 1b에서, 전형적인 원심분리 속도 3,000 rpm에서, 혼합물 길이 10 cm에 대해, 원심분리 시간은 50 분이지만, 혼합물 길이 1 cm에 대해서는 원심분리 시간이 7 분밖에 안 된다. 하지만 짧은 길이를 요구할 수 있는 원심분리와, 원심분리 후 상을 분리할 때 시험 수행인이 취급하기 쉬운 점에서 최적의 관계를 찾아내는 것이 중요하다.
5. 게다가 그래프용액 상을 분리하는 시험 조건을 규정할 때 예상되는 3 번째 ‘가상상(pseudo-phase)’인 콜로이드를 고려하는 것이 중요하다. 크기가 $0.2 \mu\text{m}$ 이하인 이 입자들은 고체 현탁 물질에 함유된 물질의 전체 흡착 메커니즘에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 위에서 설명한 것처럼 원심분리를 하는 경우, 콜로이드가 액상에 남아있어, 액상과 함께 분석해야 한다. 그러므로 이 입자들의 영향에 관한 정보를 잃는다. 시험을 실행하는 시험실에 초원심분리기 혹은 한외여과 설비가 있는 경우, 콜로이드에 대한 물질의 흡착을 포함해, 토양에 함유된 물질의 흡착/탈착에 대해 더욱 깊이 연구할 수 있다. 이런 경우, 3 개의 상(토양, 콜로이드, 용액)을 분리하기 위해, 60,000 rpm의 초원심분리기 혹은 공극률이 100,000 돌턴(dalton)인 필터가 달린 초여과 설비를 사용해야 한다. 3 개의 상에 대한 물질 분석을 하기 위해, 앞으로 설명할 시험 절차도 이에 맞게 수정해야 된다.

그림 1a. 다른 토양 밀도(ρ_s)에 대한, 원심분리 시간(t) 對 원심분리 속도(rpm)의 변화. 25

℃에서, $R_t = 10 \text{ cm}$, $R_b - R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\rho_s = 1.0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

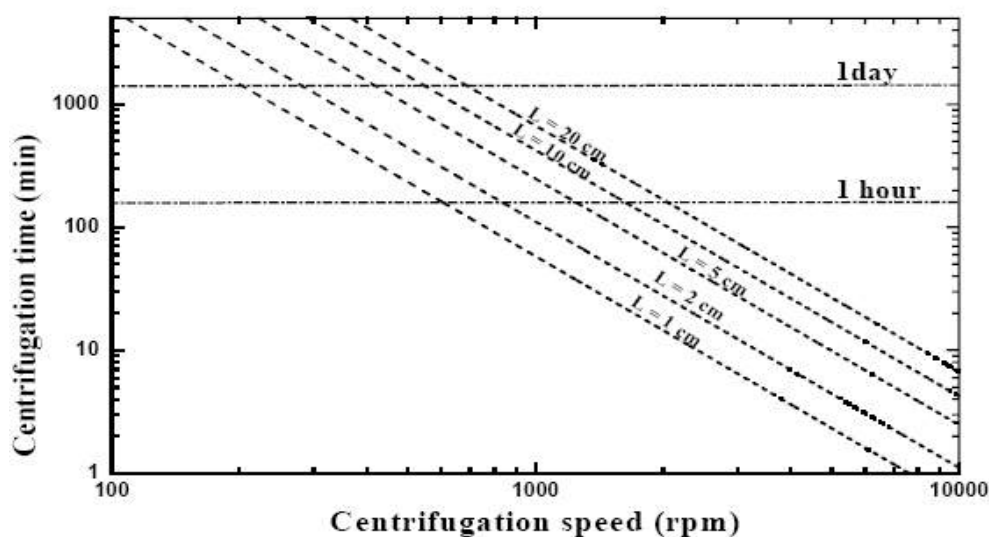


Centrifugation time(min) ; 원심분리 시간(분)

Centrifugation speed(rpm) ; 원심분리 속도(rpm), 1 day ; 하루, 1 hour ; 1 시간

그림 1b. 원심분리기 시험관($R_b - R_t = L$) 속 혼합물의 다른 길이에 대한, 원심분리

시간(t) 對 원심분리 속도(rpm)의 변화. 25 ℃에서, $R_t = 10 \text{ cm}$, $\eta = 8.95 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, $\rho_{aq} = 1.0 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$, $\rho_s = \text{이에 대} \cdot \text{cm}^{-3}$

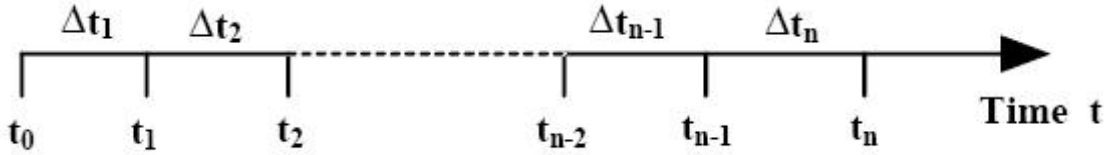


Centrifugation time(min) ; 원심분리 시간(분)

Centrifugation speed(rpm) ; 원심분리 속도(rpm)

부록 6. 흡착 'A(%)' 및 탈착 'D(%)'의 계산

시험절차의 시간 계획은 다음과 같다.



Time(t); 시간(t)

모든 계산에서 시험 물질은 안정하고, 용기 벽에 많은 양이 흡착되지 않는다고 가정한다.

1. 흡착 'A(%)'

1.1 병렬 방법

흡착율은 다음 방정식에 따라, 각 시간 포인트(t_i)에서, 각 시험 시험관(i)에 대해 계산한다.

$$A_{ti} = m^{\text{ads}}_s(t_i) \cdot 100 / m_0 \quad (\%) \quad (1)^\ddagger$$

이 방정식의 항은 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$m_0 = C_0 \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (2)$$

$$m^{\text{ads}}_s(t_i) = m_0 - C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(t_i) \cdot V_0 \quad (\mu\text{g}) \quad (3)$$

여기서,

A_{ti} = 시간 포인트 t_i 에서 흡착율 (%)

$m^{\text{ads}}_s(t_i)$ = 시간 포인트 t_i 에서 토양에 흡착되는 시험 물질의 질량 (μg)

m_0 = 시험 초기에 시험 시험관속의 존재하는 시험 물질의 질량 (μg)

C_0 = 토양과 접촉하는 시험 용액의 초기 질량 농도 ($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)

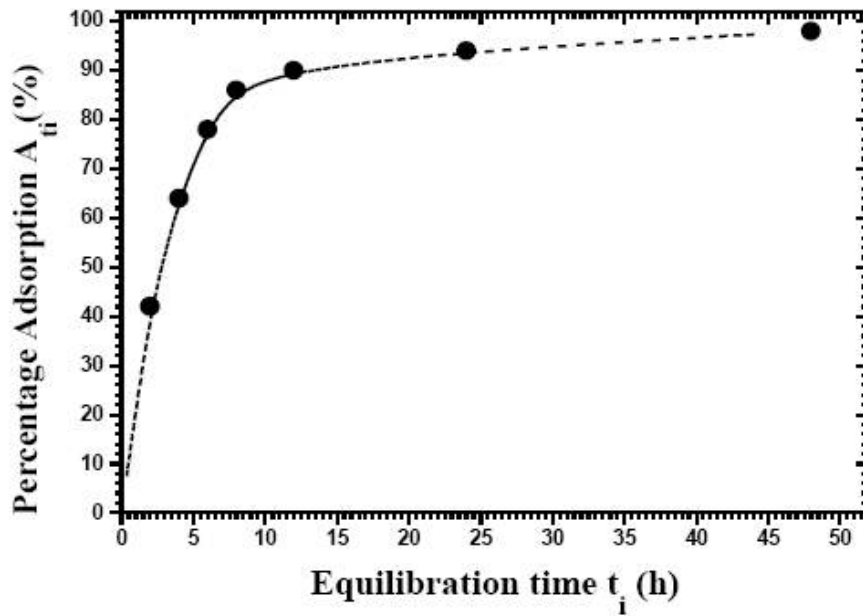
$C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(t_i)$ = 분석할 때 시간 t_i 에 액상에 함유된 물질의 질량 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$). 이 농도는 바탕 시험군에 의해 주어진 값을 고려한 분석으로 결정한다.

V_0 = 토양과 접촉하는 시험 물질의 초기 부피(cm^3)

흡착율 A_{ti} 혹은 $C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(t_i)$ 값과 시간으로 그래프를 만드는데, 시간은 수착 평형을 얻은 후 결정한다. 이런 그래프의 예가 그림 1 및 2에 각각 주어진다.

‡ 직접 및 간접 방법에 다 적용할 수 있는 방정식. 다른 모든 방정식은 간접 방법에만 적용할 수 있다.

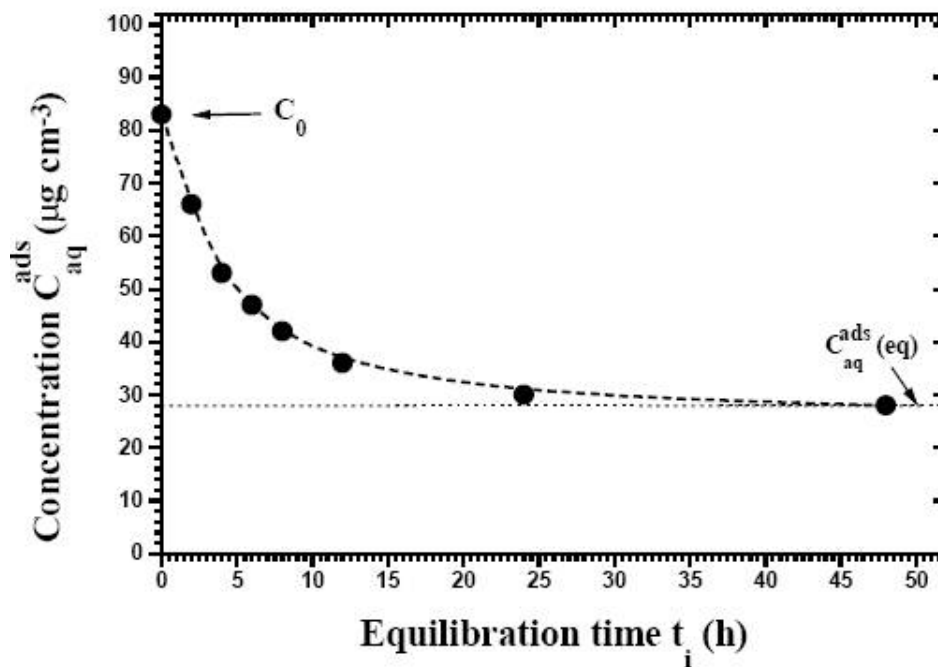
그림 1. 흡착 평형 그래프



Percentage Adsorption(%) ; 흡착율(%)

Equilibration time t_i (h) ; 평형 시간 t_i (시간)

그림 2. 액상(C_{aq})에 함유된 시험 물질의 질량 농도 對 시간 그래프



Concentration C_{aq}^{ads} ($\mu g \cdot cm^{-3}$); 농도 C_{aq}^{ads} ($\mu g \cdot cm^{-3}$), Equilibration time t_i (h); 평형 시간 t_i (시간)

1.2 직렬 방법

다음 방정식은 특정 시간 간격으로, 적은 양의 분할 검액에 함유된 시험 물질을 측정할 때, 흡착 절차의 실행을 고려한 방정식이다.

1.2.1 각 시간 간격 동안, 토양에 흡착되는 물질의 양은 다음과 같이 계산한다.

(1) 첫 번째 시간 간격 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ 에 대해

$$m_{s}^{ads}(\Delta t_1) = m_0 - m_{m}^{ads}(t_1)(V_0/v_a^A) \quad (4)$$

(2) 두 번째 시간 간격 $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ 에 대해

$$m_{s}^{ads}(\Delta t_2) = m_{m}^{ads}(t_1)(V_0/v_a^A) - m_{m}^{ads}(t_2)[(V_0 - v_a^A)/v_a^A] \quad (5)$$

(3) 세 번째 시간 간격 $\Delta t_3 = t_3 - t_2$ 에 대해

$$m_{s}^{ads}(\Delta t_3) = m_{m}^{ads}(t_2)[(V_0 - v_a^A)/v_a^A] - m_{m}^{ads}(t_3)[(V_0 - 2 v_a^A)/v_a^A] \quad (6)$$

(3) n 번째 시간 간격 $\Delta t_n = t_n - t_{(n-1)}$ 에 대해

$$m_{s}^{ads}(\Delta t_n) = m_{m}^{ads}(t_{(n-1)})[(V_0 - (n - 2)v_a^A)/v_a^A] - m_{m}^{ads}(t_n)\{[V_0 - (n - 1)v_a^A]/v_a^A\} \quad (7)$$

1.2.2 각 시간 간격 $A_{\Delta ti}$ 에서 흡착율은 다음 방정식을 사용해 계산한다.

$$A_{\Delta ti} = [m_{s}^{ads}(\Delta t_i)/m_0]100 \quad (\%) \quad (8)^{\dagger}$$

반면에, 흡착율(A_{ti})은 시간 포인트 t_i 에서 다음 방정식으로 주어진다.

$$A_{ti} = \left[\sum_{j=\Delta ti}^{\Delta ti} m_{s}^{ads}(j)/m_0 \right] 100 \quad (\%) \quad (9)^{\dagger}$$

흡착율 A_{ti} 혹은 $A_{\Delta ti}$ (연구의 필요에 따라) 값과 시간으로 그래프를 만드는데, 시간은 수착 평형을 얻은 후 결정한다.

1.2.3 평형 시간 t_{eq} 에서

(1) 토양에 흡착된 시험 물질의 질량은 다음과 같다.

$$m_{s}^{ads}(eq) = \sum_{\Delta ti=1}^n m_{s}^{ads}(\Delta t_i) \quad (10)^{\dagger}$$

(2) 용액에 함유된 시험 물질의 질량은 다음과 같다.

$$m_{s}^{ads}(eq) = m_0 - \sum_{\Delta ti=1}^n m_{m}^{ads}(\Delta t_i) \quad (11)^{\dagger}$$

(3) 평형에서 흡착율은 다음과 같다.

$$A_{eq} = (m_{s}^{ads}(eq)/m_0)100 \quad (\%) \quad (12)^{\ddagger}$$

‡ 직접 및 간접 방법에 다 적용할 수 있는 방정식. 다른 모든 방정식은 간접 방법에만 적용할 수 있다.

위에서 사용한 매개변수들은 다음과 같이 정의한다.

$m_{s}^{ads}(\Delta t_1), m_{s}^{ads}(\Delta t_2), \dots, m_{s}^{ads}(\Delta t_n)$ = 각 시간 간격 $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ 에서 토양에 흡착되는 물질의 양(μg).

$m_{s}^{ads}(t_1), m_{s}^{ads}(t_2), \dots, m_{s}^{ads}(t_n)$, = 각 시간 포인트 t_1, t_2, \dots, t_n 에서 분할 검액 (v_a^A)으로 측정된 물질의 양(μg).

$m_{s}^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 토양에 흡착된 물질의 양(μg).

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 용액 속에 함유된 물질의 양(μg).

v_a^A = 시험 물질을 측정할 때 분할 검액의 부피 (cm^3).

$A_{\Delta ti}$ = 시간 간격 Δti 에 해당하는 흡착율(%).

A_{eq} = 흡착 평형에서 흡착율(%).

2. 탈착 'D(%)'

탈착 열역학 시험이 시작되는 시간 t_0 은, 시험 물질 용액이 최대로 복원되는 부피가 같은 부피의 0.01 M 염화칼슘 용액으로 교체되는 순간으로 고려된다.

2.1 병렬 방법

2.1.1 시간 포인트 t_i 에서, 시험관 $i(V_r^i)$ 에서 취한 액상에 함유된 시험 물질의 질량을 측정하고, 탈착된 질량을 다음 방정식에 따라 계산한다.

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i)(V_0/V_r^i) - m_{aq}^A \quad (13)$$

흡착 평형에서 $t_i = t_{eq}$ 이므로, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ 가 된다.

시간 간격(Δt_i) 동안 탈착된 시험 물질의 질량은 다음 방정식으로 주어진다.

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_i) = m_{aq}^{des}(t_i) - \sum_{j=1}^{i-n} m_{aq}^{des}(j) \quad (14)$$

2.1.1 흡착율은 다음과 같이 계산한다.

(1) 방정식의 시간 포인트 t_i 에서

$$D_{ti} = [m_{aq}^{des}(t_i)/m_s^{ads}(eq)]100 \quad (\%) \quad (15)$$

(2) 방정식의 시간 간격(Δt_i) 동안

$$D_{\Delta ti} = [m_{aq}^{des}(\Delta t_i)/m_s^{ads}(eq)]100 \quad (\%) \quad (16)$$

여기서,

D_{ti} = 시간 포인트 t_i 에서 탈착율(%)

$D_{\Delta ti}$ = 시간 간격 Δt_i 에 해당하는 탈착율(%)

$m_{aq}^{des}(t_i)$ = 시간 포인트 t_i 에서 탈착되는 시험 물질의 질량(μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$ = 시간 간격 Δt_i 동안 탈착되는 시험 물질의 질량(μg)

$m_m^{des}(t_i)$ = 분석하는 동안 취한 용액의 부피 V_r^i 로, 시간 t_i 에서 분석으로 측정
한 시험 물질의 질량(μg)

m_{aq}^A = 완벽하지 않은 부피 치환 때문에 흡착 평형에서 남은 시험 물질의 질
량(μg)

$$m_{aq}^A = m_{aq}^{ads}(eq)[(V_0 - V_R)/V_0] \quad (17)$$

$m_{aq}^{ads}(eq)$ = 흡착 평형에서 용액 속 시험 물질의 질량(μg)

V_R = 흡착 평형을 얻은 후, 시험관에서 제거되고, 같은 부피의 0.01M 염화칼
슘 용액으로 치환된 상등액의 부피(cm^3)

V_r^i = 탈착 열역학 시험에서, 시험 물질 측정을 위해 시험관(i)에서 취한 용액
의 부피(cm^3)

탈착율 D_{ti} 혹은 $D_{\Delta ti}$ (연구의 필요에 따라) 값과 시간으로 그래프를 만드는데,
시간은 흡착 평형을 얻은 후 결정한다.

2.2 직렬 방법

2.2.1 다음 방정식은 특정 시간 간격으로, 적은 양의 액상 분할 검액(v_a^A)에 함유된 시험 물질을 측정할 때, 이전의 흡착 절차의 실행을 고려한 방정식이다(2.1.13 직렬 방법 섹션 참조). 흡착 열역학 시험 후 시험관에서 제거된 상등액의 부피가 같은 부피의 0.01 M 염화칼슘 용액(V_R)으로 치환되고, 탈착 열역학 시험 동안 토양(V_T)과 접촉하는 액상의 총 부피는 변하지 않고 다음 방정식으로 주어진다고 가정한다.

$$V_T = V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i) \quad (18)$$

2.2.2 시간 포인트 t_i 에서

(1) 시험 물질의 질량은 적은 양의 분할 검액(v_a^D)으로 측정하고, 탈착된 질량은 다음 방정식에 따라 계산한다.

$$m_{aq}^{des}(t_i) = m_m^{des}(t_i)(V_T/v_a^D) - m_{aq}^A\{[V_T - (i-1)v_a^D]/V_T\} \quad (19)$$

(2) 흡착 평형에서, $t_i = t_{eq}$ 이므로, $m_{aq}^{des}(t_i) = m_{aq}^{des}(eq)$ 이다.

(3) 탈착율 D_{ti} 는 다음 방정식으로 계산한다.

$$D_{ti} = [m_{aq}^{des}(t_i)/m_s^{ads}(eq)]100 \quad (\%) \quad (20)$$

2.2.3 시간 간격 Δt_i 에서

(1) 각 시간 간격 동안 흡착된 물질의 양은 다음과 같이 계산한다.

첫 번째 시간 간격 $\Delta t_1 = t_1 - t_0$ 에 대해

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_1) = m_m^{des}(t_1)(V_T/v_a^D) - m_{aq}^A \text{이고}$$

$$m_s^{des}(t_1) = m_s^{aq}(eq) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1) \text{이다.} \quad (21)$$

두 번째 시간 간격 $\Delta t_2 = t_2 - t_1$ 에 대해

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_2) =$$

$$m_m^{des}(t_2)(V_T/v_a^D) - m_{aq}^{des}(\Delta t_1)[(V_T - v_a^D)/V_T] - m_{aq}^A[(V_T - v_a^D)/V_T] \text{이고}$$

$$m_s^{des}(t_2) = m_s^{aq}(eq) - [m_{aq}^{des}(\Delta t_1) + m_{aq}^{des}(\Delta t_2)] \text{이다.} \quad (22)$$

n 번째 시간 간격 $\Delta t_n = t_n - t_{(n-1)}$ 에 대해

$$m_{aq}^{des}(\Delta t_n) =$$

$$m_m^{des}(t_n)(V_T/v_a^D) - m_{aq}^A\{[V_T - (n-1)v_a^D]/V_T\}$$

$$- \sum_{i=1, n \neq 1}^{n-1} \{ [V_T - (n-i)v_a^D] / V_T \} m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \text{이고}$$

$$m_s^{des}(t_n) = m_s^{des}(eq) - \sum_{i=1, n \neq 1}^n m_{aq}^{des}(\Delta t_i) \text{이다.} \quad (23)$$

(2) 마지막으로 각 시간 간격 $D_{\Delta t_i}$ 에서 탈착율은 다음 방정식을 사용해 계산한다.

$$D_{\Delta t_i} = [m_{aq}^{des}(\Delta t_i) / m_s^{ads}(eq)] 100 \text{ (%) } \quad (24)$$

반면에 시간 포인트 t_i 에서 탈착율 D_{t_i} 는 다음 방정식으로 주어진다.

$$D_{t_i} = m_s^{des}(t_n) = \left[\sum_{j=\Delta t_i}^{\Delta t_i} m_{aq}^{des}(j) / m_s^{ads}(eq) \right] 100 \text{ (%) } \quad (25)$$

위에서 사용된 매개변수는 다음과 같이 정의된다.

$m_s^{des}(\Delta t_1), m_s^{des}(\Delta t_2), \dots, m_s^{des}(\Delta t_n)$ = 각 시간 간격 $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ 후, 토양에 흡착되고 남은 물질의 질량(μg)

$m_{aq}^{des}(\Delta t_1), m_{aq}^{des}(\Delta t_2), \dots, m_{aq}^{des}(\Delta t_n)$ = 각 시간 간격 $\Delta t_1, \Delta t_2, \dots, \Delta t_n$ 동안, 탈착된 시험 물질의 질량(μg)

$m_m^{des}(t_1), m_m^{des}(t_2), \dots, m_m^{des}(t_n)$ = 각 시간 t_1, t_2, \dots, t_n 에서 분할 검액(v_a^D)으로 측정된 물질의 질량(μg)

V_T = 직렬 방법으로 실행되는 탈착 열역학 시험을 하는 동안 토양과 접촉하는 액상의 총 부피(cm^3)

m_{aq}^A = 완벽하지 않은 부피 치환 때문에 흡착 평형에서 남은 시험 물질 질량(μg)

$$m_{aq}^A = \{ [V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i)] - V_R \} / [V_0 - \sum_{i=1}^n v_a^A(i)] m_{aq}^{ads}(eq) \quad (26)$$

V_R = 흡착 평형을 얻은 후 제거되고, 같은 부피의 0.01 M 염화칼슘 용액으로 치환된 상등액의 부피(cm^3)

v_a^D

= 직렬 방법 실행되는 탈착 열역학 시험을
하는 동안, 분석 목적으로 시험관(i)에서
취한 분할 검액의 부피(cm^3)

$$v_a^D \leq 0.02V_T$$

(27)

부록 7. 토양의 흡착/탈착: 데이터 보고서 양식

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

1. 분석 방법의 타당성

토양의 무게	g	
토양: 건조 질량	g	
염화칼슘 용액의 부피	cm ³	
최종 용액의 공칭 농도	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	
최종 용액의 분석 농도	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$	

사용된 분석 방법 원리 :

분석 방법의 보정 :

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

따른 분석 방법 간접 ☐ 병렬 ☐ 직렬 ☐

직접 ☐

2. 흡착 시험 : 시험 시료

	기호	단위	평형 시간	평형 시간	평형 시간	평형 시간	평형 시간	평형 시간	평형 시간
시험관 번호									
토양 무게		g							
토양: 건조 질량	m_{soil}	g							
무게를 단 토양 속 물의 부피 (계산)	V_{ws}	cm ³							
토양 평형을 위한 0.01M 염화칼 슘의 부피		cm ³							
표준용액의 부피		cm ³							
토양과 접촉하는 액상의 총 부 피	V_0	cm ³							
시험 용액 초기 농도	C_0	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$							
시험 초기 시험 물질의 질량	m_0	μg							
교반 및 원심분리 후									
간접 방법									
병렬 방법									
바탕 시험군 수정을 포함한 액 상에 함유된 시험 물질의 농도	$C^{\text{ads}}_{\text{aq}}(t_i)$	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$							
병렬 방법									
분할 검액(V^{A}_{d})으로 측정한 시험 물질의 질량	$m^{\text{ads}}_{\text{m}}(t_i)$	μg							
직접 방법									
토양에 흡착된 시험 물질의 질 량	$m^{\text{ads}}_{\text{s}}(t_i)$	μg							
흡착 계산									
흡착	A_{t_i}	%							
	$A_{\Delta t_i}$	%							
평균									
흡착 계수	K_d	cm ³ ·g ⁻¹							
평균									
흡착 계수	K_{oc}	cm ³ ·g ⁻¹							
평균									

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

3. 흡착 시험 : 바탕 시험군 및 대조군

	기호	단위	바탕 시험군		바탕 시험군		대조군	
시험관 번호								
토양 무게	g						0	0
무게를 단 토양에 함유된 물의 양(계산)	cm ³							
참가된 0.01M 염화칼슘 용액의 부피	cm ³							
첨가된 시험 물질 표준용액의 부피	cm ³	0	0					
액상의 총 부피(계산)	cm ³							
액상에 함유된 시험 물질의 초기 농도	μg·cm ⁻³							
교반 및 원심분리 후								
액상의 농도	μg·cm ⁻³							

주의 : 필요하면 칼럼을 첨가한다.

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

4. 물질 수지

시험관 번호	기호	단위				
토양 무게	-	g				
토양: 건조 질량	m_{soil}	g				
무게를 단 토양에 함유된 물의 부피(계산)	V_{WS}	ml				
토양 평형을 위한 0.01M 염화칼슘의 부피		ml				
표준용액의 부피		cm^3				
토양과 접촉하는 액상의 총 부피	V_0	cm^3				
시험 용액의 초기 농도	C_0	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
평형 시간	-	시				
교반 및 원심분리 후						
바탕 시험군 수정을 포함한 흡착 평형에서 액상에 함유된 시험 물질의 농도	$C_{\text{ads}}^{\text{aq}}(\text{eq})$	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
평형 시간	t_{eq}	시				
제거된 액상의 부피	V_{rec}	cm^3				
첨가된 용매의 부피	ΔV	cm^3				
용매로 1차 추출						
용매 속의 시그널 분석기	S_{E1}	변함(var.)				
용매에 함유된 시험 물질 농도	C_{E1}	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
토양 및 용기 벽에서 추출한 물질의 질량	m_{E1}	μg				
용매로 2차 회석						
제거된 용매의 부피	ΔV_{s}	cm^3				
첨가된 용매의 부피	$\Delta V'$	cm^3				
용매로 2차 추출						
용매 상의 시그널 분석기	S_{E2}	변함(var.)				
용매 속 시험 물질의 농도	C_{E2}	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$				
토양 및 용기 벽에서 추출한 물질의 질량	m_{E2}	μg				
2단계로 추출한 시험 물질의 총 질량	m_{E}	μg				
물질 수지	MB	%				

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

5. 흡착 등온선

시험관 번호	기호	단위									
토양 무게	-	g									
토양: 건조 질량	m_{soil}	g									
무게를 단 토양에 함유된 물의 부피 (계산)	V_{ws}	cm^3									
토양 평형을 위한 0.01M 염화칼슘의 부피		cm^3									
첨가된 표준용액의 부피		cm^3									
토양과 접촉하는 액상의 총 부피(계 산)	V_0	cm^3									
용액의 농도	C_0	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$									
평형 시간	-	시									
교반 및 원심분리 후											
바탕 시험군 수정을 포함한 액상에 함유된 시험 물질의 농도	$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$									
온도		°C									
단위 토양 당 흡착된 질량	$C_{\text{s}}^{\text{ads}}$	$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$									

회귀 분석 :

$K_{\text{F}}^{\text{ads}}$ 값 :

$1/n$ 값 :

회귀 계수 r^2 :

시험 되는 물질 :

시험 되는 토양 :

토양의 건조 질량 함량(105 °C, 12 시간) :%

온도 :°C

따른 분석 방법 간접 ☐ 병렬 ☐ 직렬 ☐

6. 탈착 시험

		기호	단위	시간 간격	시간 간격	시간 간격	시간 간격
흡착 단계부터 시작한 시험관 번호							
흡착 평형에서 토양에 흡착된 물질의 질량				$m_{s}^{ads}(eq)$	μg		
제거되고, 0.01M 염화칼슘으로 치환된 액상의 부피		V_R	cm^3				
토양과 접촉하는 액상의 총 부피	PM	V_0	cm^3				
	SM	V_T	cm^3				
완전하지 않은 부피 치환 때문에 흡착 평형에서 남은 시험 물질의 질량		m_{aq}^A	μg				
탈착 열역학							
시간 t_i 부터 탈착된 후, 측정된 물질의 질량		$m_m^{des}(t_i)$	μg				
시험 물질 측정을 위해 시험관(i)에서 취한 용액의 부피	PM	V_r^i	cm^3				
	SM	V_a^D	cm^3				
시간 t_i 에서 토양에서 탈착된 물질의 질량(계산)		$m_{aq}^{des}(t_i)$	μg				
시간 간격 Δt_i 동안 토양에서 탈착된 물질의 질량(계산)		$m_{aq}^{des}(\Delta t_i)$	μg				
탈착율							
시간 t_i 에서 탈착		D_{ti}	%				
시간 간격 Δt_i 에서 탈착		$D_{\Delta ti}$	%				
평형 탈착 계수		K_{des}					

PM : 병렬 방법

SM : 직렬 방법

제20항 액체크로마토그래피법에 의한 토양 및 하수 침전물의 흡착계수 산정 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 다양한 범위의 물질의 농도와 흡착 평형에서 토양 혹은 하수 침전물에 존재하는 물질의 흡착 작용을 평가하는 것이다. 흡·탈착 스크리닝시험을 통해 토양의 유기 탄소 함량 (K_{oc})으로 표준화(Normalized)한 흡착계수는 토양과 하수 침전물의 유기물질에 결합하는 화학물질의 결합력을 파악하는 데 필요한 정보를 제공하고자 한다.

2. 정의

2.1 분배계수(K_d) :

시험조건에서 흡착평형에 도달하였을 때 토양상에 있는 물질의 농도($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)를 용액상에 남아있는 물질의 농도($\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$)로 나눈 값 ($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)

2.2 Freundlich 흡착 계수(K_f) :

Freundlich 흡착 계수 로그값($\log K_f$)은 평형에서 흡착제에 흡착된 시험물질의 양(x/m)에대한 로그값($\log (x/m)$)에서 액상에서 평형 농도 C_{water} 로그값과 흡착 등온선의 기울기곱($(1/n)\log C_{\text{water}}$)을 제한값으로 계산.

2.3 유기탄소 표준흡착계수(K_{oc}) :

분배계수를 토양 중 유기물 양으로 나누어 표준화 한 값($\text{cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$)을 토양시료 중 유기물 함량(%)으로 나눈 값과 분배계수(K_d)를 곱하여 계산

2.4 기준치의 정확도 :

보통 시험 물질의 흡착계수는 배치 평형법으로 결정한 $\log (+/- 0.5)$ 범위 내에

서 추정할 수 있다(표 1 참조). 사용된 대조물질의 구조가 시험 물질의 구조와 관련 있는 경우, 높은 정확도를 얻을 수 있다.

2.5 반복성 :

적어도 2 번 실험을 실시해 결정해야 한다. 각 측정에서 얻은 $\log K_{oc}$ 값은 $\log 0.25$ 범위 내에 있어야 한다.

2.6 기준치의 재현성 :

2.6.1 HPLC법으로 48 개의 물질(대부분 살충제)을 대상으로 측정한 결과 상관 계수 R 은 0.95로서 토양의 K_{oc} 값에 관한 신뢰할 수 있는 데이터를 얻었다.

2.6.2 시험법에 대한 방법 개선과 타당성을 위해, 11 개 실험실이 참가한 실험실간 비교 시험을 실행 결과는 표 2와 같다.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험물질의 특성

1.1.1 물질의 선택

구조식, 순도, 해리상수(가능하면)를 알아야 한다. 물 및 유기 용매의 용해도, 옥탄올/물 분배계수, 가수분해 특성에 관한 정보는 유용하다.

1.1.2 대조 물질

흡착계수 K_{oc} 와 HPLC로 측정한 시험 물질의 머무름 시간을 연관시키기 위해, $\log K_{oc}/\log k'$ 보정 그래프를 만들기 위해 대조물질이 사용된다. 적어도 예상되는 시험 물질 값 위와 아래에 1 개 이상 있는 6 개의 참고 값을 사용해야 한다. 시험 물질 구조와 관련 있는 대조물질이 없는 경우에는 유사한 구조가 다른 일련의 물질을 선택해야 한다. 사용될 수 있는 물질과 K_{oc} 값 목록이 하수 침전물에 대해서는 표 1에, 토양에 대해서는 표 3에 제시하였다. 다른 보정 물질을 선택하는 경우, 정당성을 입증해야 한다.

1.2 시험의 적용성

1.2.1 적절한 검출 시스템[즉, 분광 광도계(Spectrophotometer), 방사능 검출기(Radioactivity detector)가 설치되어 있고 화학물질(방사성동위원소 표식, 또는 비표식)이 실험 기간 동안 충분히 안정한 경우에 HPLC법을 사용할 수 있다.

1.2.2 다른 실험 시스템에서는 연구하기 힘든 화학물질(즉, 휘발성 물질, 분석으로 측정할 수 있는 농도에서 물에 용해되지 않는 물질, 항온처리 시스템의 표면과 높은 친화성을 보이는 물질)에 유용할 수 있다.

1.2.3 불명확한 용출밴드(Elution band)를 보이는 혼합물에도 사용할 수 있다. 이런 경우, 시료 중 화합물의 $\log K_{oc}$ 상한값과 하한값을 설명해야 한다.

1.2.4 HPLC법 결과 해석 시, 가끔 불순물 때문에 문제가 발생할 수 있지만, 분석을 통해 시험 물질이 명확하게 확인되고 불순물과 분리되는 한, 이 문제는 별로 중요하지 않다.

1.2.5 표 2에 기술된 물질 목록에 대한 방법의 타당성을 입증했고, 또한 다음 화학물질 분류에 속하는 다른 다양한 화학물질에도 이 방법을 적용했다.

- 방향족 아민(즉, Trifluralin, 4-chloroaniline, 3,5-dinitroaniline, 4-methylaniline, N-methylaniline, 1-naphthylamine)
- 방향족 탄산 에스테르(즉, Benzoic acid methylester, 3,5-dinitrobenzoic acid ethylester)
- 방향족 탄화수소(즉, Toluene, xylene, ethylbenzene, nitrobenzene, 1,2,3-trichlorobenzene)
- 방향족 옥시페녹시프로판산 에스테르(즉, Diclofop-methyl, fenoxaprop-ethyl, fenoxaprop-P-ethyl)
- 벤지이미다졸 및 이미다졸 곰팡이 제거제 (즉, Carbendazim, fuberidazole, triazoxide)
- 탄산 아마이드(즉, 2-chlorobenzamide, N,N-dimethylbenzamide, 3,5-dinitrobenzamide N-methylbenzamide, 2-nitrobenzamide, 3-nitrobenzamide)
- 염소화 탄화수소(즉, Endosulfan, DDT, hexachlorobenzene, quintozone)
- 유기 인계 살충제(즉, Azinphos-methyl, disulfoton, fenamiphos, isofenphos, pyrazophos, sulprofos, triazophos)

- 페놀(즉, 페놀, 2-nitrophenol, 4-nitrophenol, pentachlorophenol, 2,4,6-trichlorophenol, 1-naphtol)
- 페닐우레아 유도체(즉, Isoproturon, monolinuron, pencycuron)
- 안료 염료(즉, Acid Yellow 219, Basic Blue 41, Direct Red 81)
- 다방향족 탄화수소계(즉, Acenaphtene, naphthalene)
- 1,3,5-triazine 제초제(즉, Prometryn, propazine, simazine, terbutryn)
- 트리아졸 유도체(즉, Tebuconazole, triadimefon, tradimenol, triapenthenol)

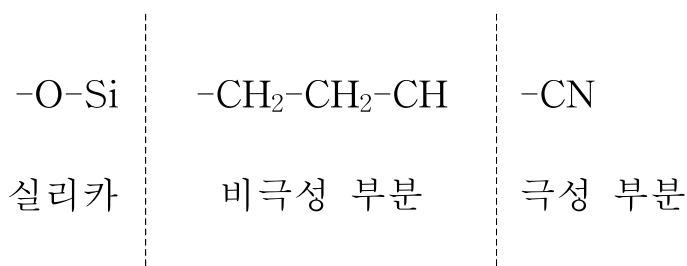
1.2.6 용리액 혹은 정지상과 반응하는 물질, 무기 성분(즉, 점토 미네랄과 클러스터 착화합물 형성)과 특정한 방법으로 상호작용하는 물질, 계면활성제, 무기 화합물, 중간 혹은 강 유기산 및 염기에 사용할 수 없다.

1.2.7 1.5 ~ 5.0 범위의 $\log K_{oc}$ 값을 결정할 수 있다. 완충 이동상을 사용해, 이온화 가능한 물질을 측정해야 하지만, 완충 성분 혹은 시험 물질이 침전되지 않도록 주의해야 한다.

2. 시험 방법

2.1. 원리

지방 친화성, 극성 물질(Lipophilic and polar moieties)을 함유한 시아노프로필(Cyanopropyl) 고체상으로 채운 분석용 칼럼으로 HPLC법을 실행한다. 실리카 매트릭스에 근거해, 중간 극성 정지상을 사용한다.



pH는 특히 극성 물질의 수착 작용에 커다란 영향을 미친다. 농업용 토양 혹은 하수처리장 탱크의 pH 값은 보통 5.5 ~ 7.5 사이다. 적어도 시료의 10 %가 pH 5.5 ~ pH 7.5 사이에서 해리되는 경우에만, 이온화 가능한 물질에 대해, 적절한 완충용액에서 이온 및 비이온 형태로 2 개의 시험을 실행해야 한다.

평가시, HPLC 머무름 시간과 흡착계수 사이의 관계만 고려하기 때문에, 어떤 정량분석도 필요하지 않고, 머무름 시간만 결정하면 된다. 적절한 대조물질을 사용해야 하며, 표준 실험 조건을 사용하는 경우, 빠르고 유용한 흡착 계수 K_{oc} 추정 방법을 제공해야 한다.

2.2 흡착 계수 예비 추정

옥탄올/물 분배계수 $P_{ow}(= K_{ow})$ 그리고 물 용해도를 어느 정도 비이온 물질의 흡착 정도를 지적해주는 지표로 사용할 수 있고 예비 범위를 찾는데 사용할 수 있다.

2.3 기구

2.3.1 무진동 펌프(Pulse-free pump)와 적절한 검출 장치에 맞는 액체 크로마토그래피가 필요하다.

2.3.2 고리(Loop)가 달린 주입 밸브를 사용하는 것이 바람직하다.

2.3.3 실리카 베이스에 화학적으로 결합한 상업용 시아노프로필(Cyanopropyl)을 사용해야 한다(즉 Hypersil, zorbax CN).

2.3.4 같은 물질로 만든 보호 칼럼(Guard column)을 주입 시스템과 분석 칼럼 사이에 놓을 수 있다.

2.3.5 다른 공급자가 만든 칼럼은 분리 효율성이 상당히 다를 수 있다.

2.3.6 다음 용량 인자 k' 는 다음과 같이 돼야 된다.: 이동상으로 메탄올/물 55/45%를 사용한 경우, $\log K_{oc} = 3.0$ 대해 $\log k' > 0.0$, $\log K_{oc} = 2.0$ 대해 $\log k' > -0.4$, \log .

2.4. 이동상

2.4.1 여러 개의 이동상을 시험하는데, 다음 2 개의 이동상이 추천된다.

2.4.1.1 메탄올/물(55/45 % v/v)

2.4.1.2 메탄올/0.01 M 구연산염 완충용액(pH 6.0)(55/45 % v/v) 사용하기 전에 혼합물의 기체를 제거한다. 정조성 용출법(Isocratic elution)을 사용해야 한다.

2.4.1.3 메탄올/물 혼합물이 없는 경우, 메탄올/물 혼합물 혹은 아세토니트릴/물 혼합물 등의 다른 유기 용매/물 혼합물을 사용할 수 있다. 이온화 가능한 물질에 대해, pH를 안정시키기 위해, 완충용액을 사용하는 것이 바람직하다. 일부 유기상/완충 혼합물로 발생할 수 있는 염 침전과 칼럼 훼손을 주의해야 한다.

2.4.1.4 정지상의 수작 특성에 영향을 줄 수 있기 때문에, 이온 쌍 결합 시약(Ion pair reagent)과 같은 첨가물을 사용하면 안 된다. 이런 이유로, 첨가물을 사용하는 실험을 하는 경우, 각각 다른 칼럼을 사용해야 한다.

2.5 용질

시험 및 대조물질을 이동상에서 용해시켜야 한다.

3. 시험 타당성

3.1 시험 조건

측정하는 동안, 온도를 기록해야 한다. 시험 물질을 보정, 추정, 측정하는 동안, 일정한 조건을 조성하기 위해, 온도가 조절되는 칼럼 오븐(a temperature controlled column compartment)의 사용이 강력히 추천된다.

3.2 불감시간(Dead time: t_0) 결정

불감시간 t_0 을 결정하기 위해, 2 개의 다른 방법을 사용할 수 있다.

3.2.1 동족 계열(Homologous series)로 불감 시간 t_0 결정이 절차로 신뢰성 있고 표준화된 t_0 값을 결정할 수 있다고 입증됐다. 상세한 설명은, OECD 시험 지침서 117의 분배계수(n -옥탄올/물), HPLC법을 참조한다.

3.2.2 칼럼에 머무르지 않은 불활성 물질로 불감시간 t_0 결정이 기법은 포름아마이드, 유레아, 혹은 질산나트륨 용액의 주입에 근거한다. 적어도 2 번 측정해야 한다.

3.3 머무름 시간(Retention time: t_R) 결정

3.3.1 대조물질을 선택해야 한다.

3.3.2 각 참고 표준용액이 다른 참고 표준용액에 영향을 받지 않는 경우, 대조물질의 머무름 시간을 결정하기 위해, 대조물질을 혼합 표준용액으로 주입 할 수 있다.

3.3.3 칼럼 기능에 예상하지 않던 변화를 설명하기 위해, 적어도 하루 2 번 적절한 시간 간격으로 보정을 해야 한다. 최상의 결과를 얻기 위해, 머무름 시간이 표류하지 않는다는 것을 확인하기 위한 시험 물질의 주입 전후, 보정 주입을 실행해야 한다.

3.3.4 가능한 한 적은 양의 시험 물질을 각각 주입하면, 시험 물질의 머무름 시간을 결정할 수 있다.

3.4 평가

3.4.1 방정식 (4)에 따라, 선택한 대조물질의 불감 시간 t_0 와 머무름 시간 t_R 로 용량 인자 k' 를 계산한다.

3.4.2 표 2 및 3에 주어진 배치 평형 실험으로 얻은 대조물질의 $\log k'$ 값과 $\log K_{oc}$ 값으로 그래프를 만든다. 이 그래프를 이용해, 시험 물질의 $\log k'$ 값을 구하고 이를 이용해 $\log K_{oc}$ 값을 결정한다.

3.4.3 실제 결과에서 시험 물질의 $\log K_{oc}$ 값이 보정 범위 밖에 있는 경우, 더 적절한 다른 대조물질을 사용해, 시험을 반복한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 보고

보고서는 다음 정보를 포함해야 한다.

- 1.1 시험기관의 명칭 및 소재지
- 1.2 시험책임자 및 담당자 성명
- 1.3 시험 및 대조물질의 확인, 순도, pK_a 값(관련이 있는 경우)
- 1.4 장비 및 작동 조건에 대한 설명, 즉 분석(및 가드) 칼럼, 검출 방법, 이동상(성분 비율 및 pH), 실험하는 동안 온도 범위
- 1.5 불감 시간, 결정에 사용된 방법
- 1.6 칼럼에 넣은 시료 및 대조물질의 양
- 1.7 보정을 위해 사용된 참고 화합물의 머무름 시간

1.8 적합한 회귀선($\log k'$ 對 $\log K_{oc}$)에 대한 설명, 회귀선 그래프

1.9 평균 머무름 데이터, 시험 화합물의 추정 ' $d \log K_{oc}$ ' 값

1.10 크로마토그램

- 주1) W. Kördel, D. Hennecke, M. Herrmann (1997). Application of the HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on sewage sludges. Chemosphere, 35 (1/2), 121-128.
- 주2) W. Kördel, G. Kotthoff, J. Müller (1995). HPLC-screening method for the determination of the adsorption coefficient on soil - Results of a ring test. Chemosphere, 30 (7), 1373-1384.

별첨

표 1. HPLC법(주 1)(주 2)으로 토양 및 하수 침전물의 K_{oc} 값과 계산 값의 비교

물질	CAS 번호	log K_{oc} 하수 침전물	log K_{oc} HPLC	Δ	log K_{oc} 토양	log K_{oc} HPLC	Δ
Atrazine	1912-24-9	1.66	2.14	0.48	1.81	2.20	0.39
Linuron	330-55-2	2.43	2.96	0.53	2.59	2.89	0.30
Fenthion	55-38-9	3.75	3.58	0.17	3.31	3.40	0.09
Monuron	150-68-5	1.46	2.21	0.75	1.99	2.26	0.27
Phenanthrene	85-01-8	4.35	3.72	0.63	4.09	3.52	0.57
Benzoic acid phenylester	93-99-2	3.26	3.03	0.23	2.87	2.94	0.07
Benzamide	55-21-0	1.60	1.00	0.60	1.26	1.25	0.01
4-Nitrobenzamide	619-80-7	1.52	1.49	0.03	1.93	1.66	0.27
Acetanilide	103-84-4	1.52	1.53	0.01	1.26	1.69	0.08
Aniline	62-53-3	1.74	1.47	0.27	2.07	1.64	0.4.
2,5-Dichloroaniline	95-82-9	2.45	2.59	0.14	2.55	2.58	0.03

표 2. HPLC법(주 3)을 개선 및 타당성 확보를 위해 실행된 실험실간 비교 테스트(11개 실험실이 참가) 결과

물질	CAS 번호	log K_{oc} [OECD 106]	K_{oc}	log K_{oc}
			[HPLC 법]	
Atrazine	1912-24-9	1.81	78 ± 16	1.89
Monuron	150-68-5	1.99	100 ± 8	2.00
Triapenthenol	77608-88-3	2.37	292 ± 58	2.47
Linuron	330-55-2	2.59	465 ± 62	2.67
Fenthion	55-38-9	3.31	2062 ± 648	3.31

표 3. 토양 흡착 데이터를 근거한 HPLC 스크리닝 방법에 대해 추천되는 참고물질

참고 물질	CAS 번호	배치 평형에서 얻은 log K _{oc} 평균값	K _{oc} 데이터 수	log S.D.	출처
Acetanilide	103-84-4	1.25	4	0.48	a
Phenol	108-95-2	1.32	4	0.70	a
2-Nitrobenzamide	610-15-1	1.45	3	0.90	b
N,N-dimethylbenzamide	611-74-5	1.52	2	0.45	a
4-Methylbenzamide	619-55-6	1.78	3	1.76	a
Methylbenzoate	93-58-3	1.80	4	1.08	a
Atrazine	1912-24-9	1.81	3	1.08	c
Isoproturon	34123-59-6	1.86	5	1.53	c
3-Nitrobenzamide	645-09-0	1.95	3	1.31	b
Aniline	62-53-3	2.07	4	1.73	a
3,5-Dinitrobenzamide	121-81-3	2.31	3	1.27	b
Carbendazim	10605-21-7	2.35	3	1.37	c
Triadimenol	55219-65-3	2.40	3	1.85	c
Triazoxide	72459-58-6	2.44	3	1.66	c
Triazophos	24017-47-8	2.55	3	1.78	c
Linuron	330-55-2	2.59	3	1.97	c
Naphthalene	91-20-3	2.75	4	2.20	a
Endosulfan-diol	2157-19-9	3.02	5	2.29	c
Methiocarb	2032-65-7	3.10	4	2.39	c
Acid Yellow 219	63405-85-6	3.16	4	2.83	a
1,2,3-Trichlorobenzene	87-61-6	3.16	4	1.40	a
γ-HCH	58-89-9	3.23	5	2.94	a
Fenthion	55-38-9	3.31	3	2.49	c
Direct Red 81	2610-11-9	3.43	4	2.68	a
Pyrazophos	13457-18-6	3.65	3	2.70	c
α-Endosulfan	959-98-8	4.09	5	3.74	c
Diclofop-methyl	51338-27-3	4.20	3	3.77	c
Phenanthrene	85-01-8	4.09	4	3.83	a
Basic Blue 41(mix)	26850-47-5 12270-13-2	4.89	4	4.46	a
DDT	50-29-3	5.63	1	-	b

a : W. Kördel, J. Müller (1994). Bestimmung des Adsorptionskoeffizienten organischer Chemikalien mit der HPLC. UBA R & D Report No. 106 01 044 (1994).

b : B.V. Oepen, W. Kördel, W. Klein. (1991). Chemosphere, 22, 285-304.

c : 산업에서 제공한 데이터

제21항 나노물질의 입자크기 및 크기분포 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 전자현미경을 이용하여 나노(10^{-9})미터 수준의 ‘입자(Particle)’ 또는 ‘섬유(Fiber)’의 크기 및 크기분포를 측정하는데 있다.

2. 정의

2.1. 입자(Particle)

뚜렷이 구분되는 물리적 경계를 가진 물질의 미세한 조각(Piece)

2.2. 섬유(Fiber)

두 차원의 크기(너비와 높이, x)가 유사하며 나머지 한 차원의 크기(길이, l)에 대한 종횡비(l/x)가 3 이상인 입자상 물질

2.3. 입자크기(Particle size)

입자의 외형 치수로서 물리적 경계면에 대한 선형적 길이를 말함. 입자의 크기는 면적등가지름 또는 최대·최소페렛지름으로 나타낼 수 있음

2.4. 페렛지름(Feret's diameter)

입자의 물리적 경계면에 접한 두 평행선 사이의 거리로서 가능한 가장 긴 거리는 최대페렛지름, 가장 짧은 거리는 최소페렛지름으로 나타냄

2.4. 입자크기분포(Particle size distribution)

입자의 수를 기준으로 한 크기의 분포

2.5. 구성입자(Constituent particle)

구성입자는 입자가 존재 또는 관찰되는 형태와 관계없이 모든 개별의 입자를 의미하며, 입자는 입자간의 경계면이 분리되어 독립된 입자로 존재하거나 일정한 결합력에 의해 엉킴 또는 응집체로 존재함

2.6. 엉킴체(Agglomerate)

상대적으로 약한 물리적 에너지(예: 반데르발스힘 또는 정전기력)에 의해 두 개 이상의 입자가 각각의 경계면이 근접해 있거나 붙어있는 입자의 형태. 외부의 물리적 에너지 또는 입자가 분산되어 있는 용액의 특성에 따라 가역적으로 개별 입자 또는 응집체로 분리될 수 있음

2.7. 응집체(Aggregate)

입자들이 강하게 결합된 형태(예를 들면, 용융(Fused), 소결(Sintered) 또는 금속 결합(Metallically bonded))로서 엉킴체와는 달리 개별 입자 또는 응집체로 분리되지 않는 비가역적 형태

3. 적용범위

본 시험법은 크기가 1 nm ~ 1,000 nm인 입자 또는 섬유 크기의 크기 및 크기분포를 측정하는데 적용한다. 섬유는 지름과 길이 등 두 가지의 크기를 측정하며, 길이는 최대 20 μm 까지 측정할 수 있다. 전자현미경 진공 환경과 전자빔에 안정한 입자 또는 섬유에 대해 적용 가능하다. 주 2)에서 제시하는 시료의 상태(Quality)와 섬유의 종횡비, 전자현미경의 배율에 따른 영상 해상도 등에 따라 적용이 제한될 수 있다.

II. 시험

1. 원리

전자현미경을 이용하여 입자(또는 섬유)의 영상을 확보하고 영상에 나타난 입자(또는 섬유)의 크기(또는 길이)를 측정한다. 입자의 크기는 최대·최소페렛지름(Maximum·Minimum Feret diameter) 또는 면적등가지름(Area equivalent diameter)으로 나타낸다. 섬유의 크기는 지름과 길이로 나타낸다.

전자현미경은 가속된 전자빔을 이용하여 나노 크기까지 관찰할 수 있는 해상도를 가진 장치이다. 본 시험에서는 주사전자현미경 또는 투과전자현미경이 사용된다. 주사전자현미경(SEM; Scanning Electron Microscopy, 이하 ‘SEM’)은 시료의 형태를 분석하기 위하여 사용되며, 집속전자빔(Focused electron beam)을 시료에 주사하여 표면형태에 민감한 2차 전자(Secondary electron) 또는 물질조성 차이에 민감한 후방산란(Back-scattered) 전자를 검출하여 시료에 대한 2차원 영상을 생성한다. 투과전자현미경(TEM; Transmission Electron Microscopy, 이하 ‘TEM’)은 시료를 통과하는 투과전자를 검출하며, 시료의 2차원 영상을 생성한다.

2. 시험의 준비

2.1. 시료 채취

시료로부터 대표성 있는 시험용 시료를 채취하기 위해 시료의 특성을 고려한 시료채취 방법을 선택하여야 한다.

2.2. 시료의 전처리

2.2.1. 분산

크기를 측정하기 위해 입자를 분산시킨다. 나노물질은 응집되는 경향이 있으므로 신뢰할 수 있는 대푯값을 얻기 위해서는 안정된 분산 상태의 유지가 필요하다. 대상 입자의 특성에 따라 적절한 용매(예: 에탄올) 또는 분산제(예: 계면활성제)를 사용할 수 있다. 이 경우 사용한 용매 또는 분산제는 입자의 크기에 영향을

주지 않아야 한다. 기계적 교반이나 초음파 등 물리적 에너지를 이용하여 입자를 분산시킬 수도 있다. 이 경우 과도한 물리적 에너지에 의해 대상 나노물질이 쪼개어 지거나 초음파 프로브(Probe)로부터 작은 조각이 떨어져 나와 크기측정에 영향을 줄 수 있으므로 주의를 기울여야 한다.

2.2.2. 시험용 시료 준비

입자(또는 섬유)가 그리드(Grid) 또는 기판(Specimen stub) 위에 납작하게 놓여 최대한 중첩되지 않고 골고루 분포하도록 한다. SEM에서 입자가 충분히 구분될 수 있을 정도로 대비되어야 한다. 전자빔의 강도를 조절하거나 시료의 염색 또는 코팅 등의 전처리를 할 수 있다. 코팅 두께는 최종 입자크기에서 제외한다.

3. 시험방법

3.1. 전자현미경에 의한 입자의 크기 측정 시험

3.1.1. 영상의 확보

관찰하는 입자의 크기에 따라 적절한 해상도의 영상을 확보한다. 영상은 시험용 시료에서 공간적으로 무작위로 선택하여 확보한다. 요구되는 수만큼의 입자가 측정될 수 있도록 서로 겹치지 않는 영역에서 충분한 수의 영상을 확보한다. 크기 분포가 큰 시료의 경우에는 하나의 해상도를 갖는 영상에서 작은 크기의 입자와 큰 크기의 입자가 동시에 측정되지 않는 경우가 있다. 이러한 경우에는 서로 다른 해상도의 영상을 확보하여 각각의 영상에서 관찰된 입자의 크기를 측정한다. 이 때 동일한 해상도에서 확보한 여러 개의 영상들이 차지하는 면적의 합은 다른 해상도에서의 면적의 합과 같아야 한다.

3.1.2. 크기측정을 위한 영상 해상도

대상 입자의 크기에 따라 적절한 해상도를 갖도록 배율을 조정한다. 정확한 입자 크기를 결정하기 위해서는 일정한 최소 해상도가 필요하고, 필요한 해상도(nm/pixel)는 측정될 입자의 크기 범위에 따라 정해진다(주 1).

3.1.3. 크기를 측정하는 입자의 수

통계적으로 유의한 크기 및 크기분포를 확보하기 위해 충분한 수의 입자 또는 섬유의 크기를 측정한다. 입자의 크기측정에 요구되는 최소수는 크기분포에 따라 달라진다. 입자의 크기분포에 대한 기하표준편차(σ_g)가 1.5 이하인 경우에는 최소 300개, 기하표준편차(σ_g)가 1.5를 넘는 경우에는 최소 700개의 입자를 측정한다(주 5).

3.1.4. 입자의 크기 측정

영상에서 확인된 시료의 준비 상태가 적합한 경우(주 2), 영상 처리 소프트웨어를 이용하여 수동 또는 자동으로 입자의 크기를 측정한다. 입자의 크기는 최대·최소페렛지름 또는 면적등가지름으로 나타낸다.

3.2. 섬유의 지름 및 길이 측정 시험

3.2.1. 영상의 확보

관찰하는 섬유의 크기에 따라 적절한 해상도의 영상을 시험용 시료에서 공간적으로 무작위로 선택하여 확보한다. 요구되는 수만큼의 섬유가 측정될 수 있도록 서로 겹치지 않는 영역에서 충분한 수의 영상을 확보한다.

3.2.2. 크기측정을 위한 영상 해상도

화소 크기가 지름의 1/4 이하가 되도록 해상도를 조절한다. 지름과 길이의 중횡비가 커서 동일 해상도의 영상에서 지름과 길이를 동시에 측정하기 불가능한 경우에는 길이 측정을 위해 화소 크기가 지름의 2 배가 되도록 해상도를 조절하여 2 차 영상을 확보한다.

3.2.3. 크기를 측정하는 섬유의 수

통계적으로 유의한 크기 및 크기분포를 확보하기 위해 200개 이상의 섬유에 대해 지름 및 길이를 측정한다(주 5).

3.2.4. 섬유의 지름 및 길이 측정

영상에서 확인된 시료의 준비 상태가 적합한 경우(주 2), 영상 처리 소프트웨어를 이용하여 양쪽 끝단이 명확하게 구분되는 최소 200개의 섬유에 대한 지름 및 길이를 동시에 측정한다. 지름의 경우 한 개의 섬유를 따라 적어도 3개의 지점에서 측정하고 평균을 그 섬유에 대한 지름으로 한다. 길이는 영상에 나타난 섬유의 중앙을 따라 최대 20 μm 까지 측정한다. 지름과 길이의 중첩비가 커서 동일 해상도의 영상에서 지름과 길이를 동시에 측정하기 불가능한 경우에는 확보된 2차 영상으로부터 길이를 측정한다(주 3).

III. 시험결과의 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 영상 처리 소프트웨어를 이용하여 자동 또는 수동으로 개별입자의 크기를 측정한다.
- 1.2. 입자의 크기는 최대·최소페렛지름, 면적등가지름 등으로 나타낸다.
- 1.3. 섬유의 크기는 지름과 길이로 나타낸다.

2. 결과의 해석

- 2.1. 입자수를 기준으로 크기의 평균, 중앙값을 계산하고 크기분포를 나타낸다(주 4)
- 2.2. 입자수를 기준으로 히스토그램 분포도와 크기누적곡선을 나타낸다(주 4).

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 아래 내용을 기술한다.

- 3.1. 시험기관의 명칭, 소재지, 분석일자
- 3.2. 시험책임자 및 담당자 성명
- 3.3. 시험 나노물질에 관한 정보: 상품명, 제품명, Batch명, CAS 번호, 화학조성, 표면 개질, 기하학적 구조, 오염 가능성 등
- 3.4. 시료의 준비에 관한 정보: 시료의 양, 시료 전처리 방법
- 3.5. 분산을 위해 용매가 사용된 경우: 용매의 조성, 여과 방법, 분산제, 분산방법(예: 초음파 분산 조건(Amplitude, Plus time, Energy input), Sonicator 모델 및 제조사, Type)
- 3.6. 시료 채취 및 전처리 등 시험용 시료의 준비에 대한 추가 정보(해당되는 경우)
- 3.7. 전자현미경 및 기본 설정에 관한 정보: 장비명, 모델명, 제조사, 사용 소프트웨어 및 버전 정보, 기타 특이 사항 및 추가 정보
- 3.8. 시험용 시료 준비에 대한 추가 사항: 사용된 시료 홀더, 그리드 등
- 3.9. 크기의 측정 방법(영상 프로그램 자동 또는 수동, 최대·최소페렛지름, 등가면적 지름, 섬유지름, 섬유의 길이 등)
- 3.10. 입자수 기준 크기의 평균, 중앙값
- 3.11. 대수정규분포(Log-normal distribution) 너비 측정값으로서의 기하표준편차
- 3.12. 입자수 기준 히스토그램 분포도 및 크기누적곡선

3.13. 측정된 입자의 수 및 개별입자의 크기

3.14. 시료 준비 과정을 통해 구성입자의 크기가 측정되었다는 증거(예: 시험용 시료 준비 시 분산 전·후의 영상 비교)

3.15. 전자현미경을 통해 확보한 영상

3.16. 영상 처리 소프트웨어에서 크기 측정을 위해 처리한 영상(예: 구성입자 경계면을 나타낸 영상)

주 1) 입자의 크기 범위에 따른 전자현미경 배율 결정을 위한 해상도

입자 크기 범위 (nm)	해상도 (nm/pixel)	측정불확도 (%)
14 ~ 21	1.5 ~ 2.0	10.0 ~ 11.0
22 ~ 26	2.0 ~ 2.5	9.0 ~ 10.0
27 ~ 37	2.5 ~ 3.0	8.0 ~ 9.0
38 ~ 49	3.0 ~ 4.0	8.0
50 ~ 62	4.0 ~ 5.0	8.0
63 ~ 100	5.0 ~ 6.0	5.0 ~ 6.0
101 ~ 199	6.0 ~ 12.0	6.0
200 ~ 1,000	12.0 ~ 20.0	5.0 ~ 6.0

주 2) 시료 채취 및 준비 참고 사항

- ① 시료의 채취 및 시험용 시료의 준비는 입자크기 및 크기분포 결과에 영향을 미친다. 높은 재현성 및 낮은 편차를 갖는 대표성있는 결과를 확보하기 위해 시료 채취 및 전처리 등의 과정에서 아래의 사항을 고려한다.
- ② 실제 크기 분포를 고려한 통계적 시료채취: 시료 채취 과정에서 크기별 분획이 발생하지 않고 크기분포결과에 영향을 주지 않아야 한다. 시료채취 시기, 채취 지점 등을 다양하게 하는 방법으로 시료의 공간적 균질성 및 시간적 안정성을 확보한다. 시료의 채취방법은 ISO 14488 “Particulate materials – Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties”를 참고한다.
- ③ 시험용 시료의 전처리: 초음파처리, 교반 등의 과정에서 과도한 물리적 에너지에 의해 입자 또는 섬유의 쪼개짐이 발생할 수 있다. 분산 과정에서 부적절한 용매 사용에 의한 입자의 해리, 엉김체의 불충분한 분산 등 적절하지 못한 시료의 전처리로 입자의 크기 및 크기분포 결과에 영향을 미칠 수 있다. 세부적인 시험용 시료의 분산방법은 ISO 14887 “Sample preparation – Dispersing procedures for powders in liquids”를 참고한다.

- ④ 아래와 같이 시험용 시료의 상태를 판단한다. 시료의 상태가 측정에 적합하지 않을 경우 다시 시료를 준비한다.
- a) 최적의 상태: 영상 내 입자(또는 섬유)의 크기를 수동으로 측정 가능하며, 영상 처리 소프트웨어로 자동 측정도 가능한 상태
 - i) 입자(또는 섬유)가 서로 접촉되거나 겹치지 않고 경계가 분리된 상태
 - ii) 영상 상에 불순물이나 입자(또는 섬유)로 오인되는 허상의 수가 작으며, 측정 대상 입자(또는 섬유)와 크기, 모양, 조직 또는 명암이 뚜렷하게 구분
 - b) 크기측정이 가능한 상태: 영상 내 입자(또는 섬유)의 크기를 수동으로 측정 가능한 상태
 - i) 입자(또는 섬유)가 충분히 분리되어 있지 않고 서로 접촉되어 있으나, 대부분의 입자(또는 섬유)가 구분되는 상태
 - ii) 구성입자가 뚜렷이 구분되지 않는 영김체가 일부 존재하는 상태로서, 이러한 영김체는 크기측정에서 제외하며, 제외된 영김체의 수는 시험보고서에 기록
 - iii) 영상 상에 불순물이나 입자(또는 섬유)로 오인되는 허상의 수가 작으며, 측정 대상 입자(또는 섬유)와 크기, 모양, 조직 또는 명암이 뚜렷하게 구분
 - c) 시료상태가 크기측정에 적합하지 않은 상태: 아래의 조건 중 하나에 해당되는 조건으로 인해 수동으로 입자(또는 섬유)의 크기측정이 불가능한 상태
 - i) 영김체 또는 응집체로부터 구성입자를 구분할 수 없는 상태
 - ii) 나노물질이 전자빔이나 진공에 과도하게 민감한 상태
 - iii) 영상 상에 불순물이나 입자(또는 섬유)로 오인되는 물체가 측정 대상 입자(또는 섬유)와 구분되지 않는 상태

주 3) 섬유 크기 측정 시 참고사항

- ① 양쪽 끝단이 명확하게 구분되는 섬유들만 측정한다. 만약 섬유가 겹쳐있거나 묶여 있어 육안으로 보이는 섬유의 말단이 다른 섬유에 속해 명확하게 구분이 되지 않을 경우에는 측정에서 제외한다.

- ② 영상에서 섬유의 지름은 시험과정 또는 영상 상의 섬유와 배경의 대비에 대한 주관적 판단에 의한 불확실성이 존재한다. 영상 상에서 섬유가 배경과 충분히 대비되어 영상 프로그램에서 뚜렷하게 구분되는 경우에 결과의 재현성이 높다.
- ③ 일정 해상도의 영상에서 측정된 지름이 화소 크기의 4 배 이상인 경우가 대부분이면 지름이 화소 크기의 4 배 미만인 섬유의 측정값도 사용할 수 있다. 중앙값 계산에 있어 후자(지름 당 4 화소보다 작게 해상되는 섬유)에 의한 크기 및 크기분포의 편차는 무시할 수 있는 수준이다.
- ④ 영상 상에서 한 가닥의 섬유가 구분되지 않고 뭉쳐진 경우에는 크기측정에서 제외한다. 이러한 이유로 크기 측정에서 제외된 응집체의 수를 보고서에 기록한다.
- ⑤ 한 가닥으로 구분되어 존재하는 섬유들이 발견되지 않는 경우에는 응집체 안에 있는 섬유로부터 지름을 측정할 수 있다.

주 4) 크기분포의 결과 해석 참고 자료

- ① 크기분포의 그래프 표현은 ISO 9276-1 "Representation of results of particle size analysis – Part 1: Graphical representation"을 참고한다.
- ② 크기분포 결과의 계산 및 처리는 ISO 9276-2 "Representation of results of particle size analysis – Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions"를 참고한다.

주 5) [Draft] OECD Guideline for the Testing of Chemicals – Test Guideline on Particle Size and Particle Size Distribution of Manufactured Nanomaterials

제22항 모의 환경매체에서 나노물질의 분산안정성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 나노물질을 환경매체(지표수, 지하수 등의 천연수)와 유사한 조건이 되도록 조제한 분산용액에서 나노물질의 안전성(콜로이드 분산상태가 형성되는 정도 및 그 분산성을 유지하는 수준)을 평가하는 데 있다. 시험의 결과는 시험대상 환경매체에서의 나노물질의 거동을 파악하고 이에 따른 환경노출영향을 파악하기 위해 사용된다.

2. 정의

2.1. 엉김(Agglomeration) 및 응집(Aggregation)

엉김은 분산되어 있던 입자들이 약한 물리적 작용으로 접촉하거나 부착하여 가역적으로 서로 붙잡고 있는 상태. 응집은 엉김보다 강한 결합에 의해 입자가 비가역적으로 서로 연결된 상태

2.2. 용존유기탄소(DOC, Dissolved Organic Carbon)

물시료에 용해된 총 유기탄소 중 공극 0.45 μm 의 여과지를 통과하는 유기탄소

2.3. 분산성(Dispersibility) 및 분산 안정성(Dispersion stability)

분산성은 나노입자가 분산용매에서 분산될 수 있는 상태 또는 그 수준을 말하며, 분산 안정성(Dispersion stability)은 주어진 매질의 특성에서 일정시간 경과 후 분산성이 유지되는 정도를 말한다.

2.4. 실험 종말점(Experimental endpoint)

원심분리에 의한 침강법의 경우 분산시험 시작 6시간 이후 용액의 상층 표면으로부터 0.5 cm ~ 1 cm 아래에서 분취한 시료 중에서 측정된 나노입자의 농도.

0 시간에서의 나노입자 농도값 (C_0)에 대한 측정 시점에서의 나노입자 농도 값 (C_t)의 백분율(%)로 나타낸다.

- 실험 종말점(%) = $(C_t/C_0) \times 100$

UV-VIS 분광광도계로 농도를 측정한 연속측정법의 경우 실험 종말점은 0 시간에서의 나노입자의 흡광도(A_0)에 대한 측정 시점에서의 흡광도(A_t)를 백분율(%) [$(A_t/A_0) \times 100$]로 나타낸다.

2.5. 천연 유기물(NOM, Natural Organic Matter)

지표수나 지하수 등의 천연수에 존재하는 유기물. NOM은 부식질(Humic)과 비부식질(Non-humic, 예: 다당류)로 구성되며 필요에 따라 용존성 유기물질(DOM; Dissolved Organic Matter, 이하 'DOM')과 입자성 유기물질(POM; Particulate Organic Matter, 이하 'POM')로 구분한다. DOC는 DOM의 일부분이다.

II. 시험

1. 원리

1.1. 원심분리 침강법

50 mL 원심 분리 바이알에서 분산용액의 분산-영검-침강 절차를 기본 과정으로 설계한 것이다. 환경 매체(지표수, 지하수 등의 천연수)와 유사한 조건이 되도록 조제한 분산용액에 나노물질을 투입하고 초음파 처리한 후 일정 시간(스크리닝 시험의 경우 6 시간, 확장시험의 경우 한 시간 간격으로 6시간)에 분산용액의 상층부 표면으로부터 0.5 cm ~ 1.0 cm 아래 위치에서 시료를 분취한 후, 시료 중의 나노입자 농도를 측정한다. 분산 안정성이 유지되지 않아 침전 등이 발생하면 분취 시료 중의 나노물질 농도는 감소하게 된다. 분산안정성 평가는 실험 직후인 0 시간에서의 측정 농도 값에 대한 각 측정 시점에서의 농도 값을 백분율(%)로 나타낸다. 이를 바탕으로 분산성을 분류한다.

1.2. UV-VIS 연속측정법

분산용액의 분산-영감-침강 과정에서 나노입자에 의한 광산란으로 빛 세기가 변화하는 원리를 이용한 것으로 원심분리 침강법과 같이 처리된 측정 대상 시료를 장치에 넣고 15 분 또는 30 분마다 24 시간 동안 측정하여 침강과정을 지속적으로 모니터링 한다. 0 시간에 대한 각 측정 시점에서의 흡광도 백분율(%)로 나타낸다.

2. 시험의 준비

2.1. 고려사항

2.1.1. 분산용액의 조성

수용성 분산용액에서 반데르발스 인력 등 입자들 사이에 작용하는 힘은 주로 입자의 조성, 표면 화학, pH에 의해 좌우된다. 분산안정성을 평가하기 위한 시험용액은 자연환경 조건을 모사하는 것이 중요하다. 시험용 분산용액의 개별 성분 및 농도 범위는 이들 성분이 나노물질의 분산안정성에 미치는 효과와 자연계에서 존재하는 농도를 바탕으로 설정한다. 나노입자의 분산 안정성에 영향을 미치는 주요 요소는 pH, NOM, 다양한 음이온 및 양이온 등이다. 이 시험에서는 자연담수에서 널리 존재하고 응집에 영향을 주는 전해질로 이온 강도를 조절하기 위해 2가 이온인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 를 주로 사용한다. 나노입자의 표면전하가 음이온인 경우에는 2가 양이온인 칼슘이온을 함유한 배지로 충분하지만, 나노입자의 표면전하가 양이온인 경우에는 1가 음이온(질산염) 또는 2가의 음이온(황산염) 성분을 함유한 배지를 사용할 필요가 있다. 천연수와 유사하고 더욱 복잡한 구성을 가진 이온을 함유한 용액을 만들기 위해서 질산염, 황산염, 칼슘 및 마그네슘 등 다양한 이온을 사용할 수 있으며 이때 물 농도의 비율은 대략 자연에서 발견되는 평균 비율인 $\text{Ca}^{2+}:\text{Mg}^{2+}$ (비율 4:1), 질산염:황산염(비율 10:1)을 따라야 한다.

2.1.2. pH

pH는 입자 표면전하의 크기와 극성을 변화시킬 수 있으므로 입자의 분산성에 영향을 미치게 된다. 따라서, 이 시험에서는 서로 다른 pH 조건에서 분산성 시험을 하는 것이 필요하다.

2.1.3. 이온 강도(IS, Ionic Strength)

분산용액중의 이온의 강도에 따라 나노입자의 분산성이 달라질 수 있다. 따라서 분산용액에 존재하는 모든 이온의 농도를 측정하고 아래 식에 따라 이온 강도를 계산한다.

$$IS = 0.5 \sum_{i=1}^n c_i z_i^2$$

여기서,

IS: 이온강도

C_i : i 번째 이온의 몰 농도

Z_i : 해당 이온의 원자가

2.1.4. NOM의 농도

DOM은 0.45 μm 이하 크기의 NOM이며, 나노입자의 표면에 흡착되어 나노입자의 분산 안정성에 영향을 미친다. 일반적으로 음이온 특성을 갖는 DOM이 나노입자의 표면에 흡착될 경우, 나노입자 표면이 양전하일 경우에는 표면 전하가 음의 전하로 뒤바뀔 수도 있어 분산안정성이 저하되고 나노입자의 표면이 대전되지 않거나 음으로 대전된 경우에는 표면의 음전위가 증가되어 안정성이 더욱 좋아지게 된다. 액상의 DOM 분자는 pH 완충제 역할을 하고, 양이온인 칼슘이온의 활성을 감소시킴으로써 칼슘에 의한 효과를 감소시킨다. NOM의 농도는 천연수의 90 % ~ 95 %에서 발견되는 수준으로 한다. NOM을 사용하여 분산성 시험을 할 때에는 NOM 저장액의 특성을 잘 파악하여야 하며 아울러 이온이나 재(Ash) 성분이 함유되지 않은 정제된 것을 사용한다.

2.1.5. 입자 농도

분산용액에서의 입자 간에 일어나는 단위 시간 당 충돌 횟수를 결정하는 핵심 요소는 나노입자의 질량(Mass)이 아니라 입자 수(Number)이다. 나노입자의 분산 안정성을 비교하기 위해 입자 수 농도의 범위는 $0.5 \times 10^{12} \sim 5.0 \times 10^{12}$ (입자 수/L)로 시험할 것을 권장한다.

2.1.6. 입자 특성 및 표면화학

나노입자의 분산안정성과 관련하여 표면화학 관점에서 생각해야 할 두 가지 주요한 요소는 pH 변화에 의해서 변하지 않는 전하(Permanent charge)와 pH에 의해 영향을 받는 전하(Variable charge)이다. 또한 입자의 표면에 결합하는 코팅물질은 입체 장벽(Steric barrier)을 생성하여 나노입자의 엉김이나 응집을 방지함으로써 안정성에 영향을 미칠 수도 있다. 나노입자가 수용성 분산용액의 구성요소(즉, 이온 및 NOM)와 상호작용할 때 표면화학은 변화하므로 분산 안정성을 측정할 때는 시험대상 나노입자의 입자 특성과 표면화학을 고려한다.

2.1.7. 입자 크기 및 입자 밀도

수용성 분산용액에 존재하는 입자의 크기가 100 nm 미만인 나노물질의 경우에는 브라운 운동이 빠르게 진행되며 침강 속도가 느리다. 밀도가 같다면 입자가 큰 입자는 작은 크기의 입자보다는 빠르게 침강한다. 입자침강에는 밀도보다 입자크기가 더 큰 영향을 미치기 때문에 엉김체(Agglomerates)의 겉보기 밀도가 개별 입자의 밀도보다 작더라도 엉김체의 크기가 커지면 개별 입자보다 더 빠르게 침강한다. 100 nm ~ 1 μ m 크기의 입자는 브라운 운동의 영향을 받지 않아 침강하게 되는데, 침강속도는 개별 입자나 엉김체의 밀도에 따라 달라진다. 또한, 물의 밀도에 가까운 밀도를 갖는 입자는 엉김이 관찰될 수는 있지만 6 시간의 실험 시간 동안에 침전이 일어나지는 않는다. 이 실험의 과정 중 측정 시료를 분취하기 전에 원심분리단계를 거치는데, 이때 입자크기 1 μ m 이상의 엉김체는 침강시켜 측정 분석대상에서 제외시킨다.

2.1.8. 분산용매에서 나노물질이 용해되는 경우

특정 조건의 분산용매 상태에서 나노물질이 용해되는 경우에는 나노물질의 분산안정성이 과대평가될 수 있다 (예: pH 4에서 ZnO). 이러한 결과가 우려되는 경우에는 분석용 시료에 대해 두 가지의 방법으로 농도(총농도 및 10kDa 초고속원심분리여과액의 농도) 각각의 농도를 구하여 시험의 과대평가 여부를 판단하여야 한다.

2.2. 시험의 한계점

이 시험은 밀도가 1 kg/L을 초과하는(> 1 kg/L) 나노물질에 대해 적용가능하다. 분산용액에 대한 입자의 밀도 차이와 그 크기(부력 질량)는 특히 시료의 원심 분리 단계에서 침강 속도에 영향을 미치는 중요한 요소이다. 입자의 밀도가 1 kg/L 이하인 나노물질(덴드리머, 폴리머 등)은 크기에 관계없이 침강되지 않거나 용기의 공기/물 계면에 축적될 수 있어 이 시험 방법을 적용하는 데 한계가 있다.

2.3. 시험물질의 특성정보

나노물질의 물리화학적 지표에 대한 정보는 시험의 유효성 요건(Validity requirement)을 충족시키는지 확인하기 위해 필요하다. 시험 대상 나노물질의 조성, 밀도, 입자 크기, 비표면적, 등전점(IEP, Isoelectric Point) 및 용해(속도)에 대한 정보를 시험 시작 전에 충분히 확보하여야 하며, 시험결과 보고 시 이들에 대한 정보도 함께 보고하여야 한다. 나노 입자의 밀도와 크기는 나노입자의 입자 수 농도(Number concentration)를 얻기 위한 질량 계산 시 필요하다.

$$N = \frac{M}{\rho \times V}$$

여기서,

M : 분산용액의 나노 입자 수

M : 나노 분말의 질량(Kg)

ρ : 나노물질의 밀도(kg/m³)

V : 입자의 부피(m³). V 는 기준물질 정보를 통해 얻거나, DLS 크기로부터 입자의 부피값을 계산한다. DLS 분석방법은 ISO 22412:2008에 따른다.

2.4. 시험 검증을 위한 나노물질의 추천

나노입자에 대한 시험이나 또는 분산 안정성 시험 시스템에 대한 충분한 실행 경험이 없는 실험실의 경우에는 다음에 언급된 나노물질로 먼저 시험을 한 번 이상 수행해 볼 것을 권장한다.

- (a) 모든 조건에서 시간이 지나도 안정성이 뛰어난 Ag나노입자(예, EU NanoReg NM-300K)
- (b) 모든 시험 조건에서 안정성이 낮은 탄소나노튜브 CNTs(NM-400)
- (c) 위 두 가지 물질에 비해 중간정도의 안정성을 가진 TiO_2 (NM-105)(시험 조건에 따라 다름)

3. 시험방법

3.1. 시험조건

모든 실험은 표준 온도 및 기압 조건(25 °C, 1.00 atm)에서 3 회 반복 수행한다.

3.2. 시험의 방법

3.2.1 원심분리 침강법

(1) 스크리닝 시험

스크리닝 시험은 50 mL 원심분리 바이알에 NOM과 나노물질이 포함된 용액을 초음파 처리한 후 농도를 측정하여 분산성을 판단한다. NOM 주입 후, 전해질인 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 는 0 mM, 1 mM, 10 mM 농도로, pH는 4.0, 7.0, 9.0의 조건으로, 9가지의 조건에서 주 1)에 제시된 매트릭스의 내용에 따라 시험을 실시한다.

유도결합플라즈마(ICP, Inductively Coupled Plasma), 원자흡광도법(AAA, Atomic Absorption Analysis) 등 기기를 이용한 농도분석은 초음파 처리한 분산용액을 50 mL 원심분리 바이알에서 상층부 표면으로부터 0.5 cm ~ 1 cm 아래 위치에서 시료를 분취한 후, 시료 중의 나노입자 농도를 측정한다. 6 시간 후 원심분리하여 상등액의 농도 백분율이 10 % 이하인 경우 ‘저-분산성’으로 판정하며 90 % 이상인 경우는 ‘고-분산성’으로 판정한다.

(2) 확장시험

스크리닝 시험에서 나노물질이 각각 ‘저-분산성($\leq 10\%$)’ 또는 ‘고-분산성($\geq 90\%$)’으로 분류되지 않은 경우에는, 위와 동일한 조건하에서 6 시간 동안(0 시간 ~ 6 시간)에 걸쳐 매시간 마다 나노물질 농도를 측정하는 확장시험을 수행한다. 확장시험의 경우 pH와 전해질 농도는 스크리닝 시험과 동일한 조건으

로 수행하지만, NOM을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우를 구분하여 수행한다. NOM을 첨가하지 않은 경우에는 완충제로서 중탄산나트륨을 첨가한다. 상등액의 농도 백분율이 10 %를 초과하고 50 % 미만인 경우에는 ‘중-저 분산성’, 50 % 이상이고 90 % 미만일 경우에는 ‘중-고 분산성’으로 분류한다(주 1).

3.2.2. UV-VIS 연속측정법

UV-VIS 분광광도계를 이용한 침강성 분석은 NOM, 나노물질이 포함된 분산용액을 50 mL 바이알에서 초음파 처리한 후 주 1)에 제시된 매트릭스의 내용에 따라 9가지의 시험조건에서 실시한다. 측정대상 시료를 장치에 삽입하고 15 분 또는 30 분마다 24 시간 동안 측정하여 침강과정을 지속적으로 모니터링할 수 있다.

3.3. 시험장비 및 시약

3.3.1. 주요 시험장비

- (1) 성능이 검증된 피펫(0.1 mL, 2 mL, 5 mL 용)
- (2) 입자 분산을 위한 13 mm 직경의 초음파 프로브(전원 출력 조절 장치 포함)
- (3) 분산액의 pH 측정을 위한 직경 3 mm 마이크로 전극을 가진 pH 미터
- (4) DLS(Dynamic light scattering) 장치
- (5) 분산 저장액 조제를 위한 250 mL 유리 비이커
- (6) 분산 저장액 보관을 위한 유리 용기 또는 햇빛 차단을 위해 알루미늄-호일로 감싼 폴리프로필렌 용기
- (7) 영검 실험에 사용할 50 mL 원추형 바닥 폴리프로필렌 튜브(50 mL 원추형 바닥 원심 분리 튜브, 직경 3 cm, 높이 11.5 cm)
- (8) 나노입자 분산액 분석을 위한 유도결합플라즈마질량 분석(ICP-MS) 또는 유도결합플라즈마광학방출 분석(ICP-OES) 장치
- (9) ICP-MS, ICP-OES의 자동시료 측정용 10 mL 폴리프로필렌 튜브
- (10) 상대 원심력(rcf)이 3,000 이상 가능한 표준 원심 분리기
- (11) UV-VIS 분광광도계(연속측정법으로 측정할 경우)

3.3.2. 시약

- (1) 초순수(물, H₂O) - 시약조제 및 희석에 필요한 초순수(18 MΩ 저항)
- (2) 수산화나트륨 용액(NaOH) - 0.1 M 용액, pH 설정용
- (3) 질산(HNO₃) - 0.1 M 용액, pH 설정용
- (4) 천연 유기물(NOM) 용액(DOC 농도로서 1 g/L)
- (5) 질산 칼슘(Ca(NO₃)₂) - 0.1 M 용액, 전해질 농도 설정용
- (6) 0.1 M 농도의 NaHCO₃ 용액
- (7) 시험 나노물질(건조 분말 또는 수용성 용매에 의한 분산액 형태)

3.4. 나노물질 저장액의 조제

3.4.1. 조제 농도조건

시험용 나노물질이 건조 분말 형태인 경우, 나노물질을 초순수에 미리 습윤시켜 (Pre-wetting) 24 시간 동안 정치한다. 그 후 이를 일정 부피의 초순수에 다시 분산시켜 일정한 농도로 맞춘 저장액을 만든다. 시험용 분산용액의 나노 입자 수 농도는 리터 당 $0.5 \times 10^{12} \sim 5.0 \times 10^{12}$ 개의 입자가 존재하는 것이 좋으므로 이를 맞추기 위해서 저장액은 그 이상의 고농도로 조제하여야 한다. 다만, 저장액의 농도는 시험용 분산용액 농도의 20 배 이상을 초과하지 않도록 한다.

3.4.2. 초음파 분산

나노물질 저장액을 분산시키기 위해 초음파를 실시한다. 이때 초음파 프로브는 반드시 교정(Calibration)한 후 사용한다(주 2). 초음파 프로브를 통해 전달된 초음파 에너지를 계산하는 데 필요한 Microsoft® Excel 프로그램은 OECD 웹사이트에서 내려 받아 사용할 수 있다.

- (1) 250 mL 유리 비이커를 1 L 이상 크기의 얼음 수조에 넣고 움직이지 않도록 고정한다.
- (2) 125 mL의 초순수(Ultrapure water)와 필요한 양의 나노물질을 첨가한다.
- (3) 초음파 프로브(직경 13 mm)의 끝 부분이 비이커 중심부에 위치하면서 농축 분산저장액의 표면으로부터 2.5 cm 아래에 위치하도록 설치한다.

(4) 10 분 동안 40 W로 초음파 처리한다.

(5) 초음파 처리한 농축 분산저장액은 4 °C에서 유리용기에 보관하며, 동결하지 않는다.

시험용 나노물질이 분말형이 아닌 액상형인 경우, 해당 농도로 직접 희석하여 시험에 사용할 수 있으며 추가적인 초음파 처리를 할 필요가 없다. 나노물질 저장액은 14 일 이상 보관하지 않도록 하며, 초음파 처리 후 3 시간이 지난 저장 용액의 경우 실험 전에 초음파 처리를 하여 재분산시켜야 한다.

3.5. NOM 저장액 조제

3.5.1. 이온 또는 회분이 제거된 정제된 NOM(예: 2R101N, SRNOM, Suwannee River NOM)을 이용하여 표준원액을 준비하고 DOC 농도를 확인한다. 사용한 NOM의 화학조성을 결과에 제시한다.

3.5.2. 필요한 NOM 분말의 양을 초순수에 첨가하여 NOM의 저장액을 조제한다. 용해를 촉진하기 위해 pH를 8.0로 조정한 후 격렬히 교반하거나 또는 진탕기에서 24 시간 동안 진탕시킨다. 그 후 pH를 측정하고 필요한 경우 1 M HNO_3 또는 NaOH 용액을 사용하여 pH를 8.0로 조정한다.

3.5.3. 진공 펌프 및 멸균 필터(Bottle-top 0.2 μm 폴리에테르-설폰 필터)를 사용하여 용액을 여과한다. 그 후 NOM 저장액의 DOC 함량(예, ISO CEN EN 1484)을 분석한다. NOM 저장액은 차광 유리 용기에 넣어 4 °C에서 보관한다. NOM의 노화(Aging) 및 석출 가능성 때문에 일반적으로 조제한 NOM 저장액은 4 주 이상 보관하지 않는 것을 권장한다.

3.6. 시험용 분산용액의 조제

3.6.1. 시험대상 분산용액의 조제 순서는 주 3)을 참조한다. 먼저 초음파 처리한 나노물질 저장액의 적정 분량을 50 mL 폴리프로필렌 튜브에 옮긴 후 20 mL의 초순수로 희석한다.

3.6.2. NOM을 첨가한 조건으로 시험을 수행하는 경우, DOC 농도에 해당하는 NOM 저장액의 일정량을 첨가한다. 일반적으로 시험용 분산용액의 최종 부피가 40 mL인 경우 DOC의 농도는 10 mg/L가 적절하다.

3.6.3. 나노 안정성에 필요한 DOC의 최소 농도는 다음 식에 따라 구한 나노물질의 표면적(SA, Surface Area of nanomaterials)에 의해 결정된다. DOC의 최소 농도는 나노물질의 표면적 1 m² 당 0.004 g이 되도록 권장하고 있다. OECD 웹사이트에 게시된 Microsoft® Excel 프로그램을 내려 받아 사용하면 시료마다 필요한 DOC의 양을 간편하게 계산할 수 있다.

$$SA = C_s \times V_s \times SSA$$

여기서,

C_s : 나노물질의 농도(g/L)

V_s : 나노입자의 부피(L)

SSA : 나노입자의 비표면적(m²/g)

3.6.4. NOM을 첨가하지 않은 조건으로 시험을 수행하는 경우, 정해진 pH를 안정화 시키기 위해 NOM 대신에 중탄산나트륨 완충액을 사용하며 최종 농도는 5 mM이 되도록 한다. 아울러 이온 강도를 조절하기 위한 전해질로서 0.1 M Ca(NO₃)₂ 저장액을 첨가하되 최종 부피에서의 농도가 0 mM, 1 mM 및 10 mM이 되도록 한다. 이후 물을 첨가하여 35 mL로 부피를 조정한다.

3.6.5. pH는 각각 4.0, 7.0 및 9.0(± 0.2) 값으로 설정한 조건에서 실험한다. 시료의 pH 조정은 고농도의 HNO₃ 및 NaOH를 사용하므로 소량으로 가능하다. 대기 중의 CO₂ 영향을 최소화하기 위하여 시료채취가 수행되지 않는 한 시험 튜브를 항상 닫아두어야 한다. pH 측정을 위한 전극은 3 mm 직경인 미세전극 사용을 권장한다.

3.6.6. DOM, 완충액, 전해질 및 pH 조정액을 첨가한 후 시험용 분산용액의 부피를 최종 40 mL로 조정한다. 그 후 30 초 동안 초음파를 처리하여 시험용 분산용액 중의 입자가 시험 시작 전에 잘 분산되고 혼합되도록 한다.

3.6.7. 시험용 분산용액은 각 시험 조건마다 최소 3 회 이상 실험할 수 있도록 각각 조제한다.

3.7. 측정분석용 시료의 준비

3.7.1. 스크리닝 시험 및 확장시험의 절차에 따라 실시한 시험용 분산용액에 대해 초음파 처리, 원심분리(50 mL 바이알) 후, 용액의 상층부 표면으로부터 0.5 cm ~ 1 cm 되는 지점에서 각 측정 시점마다 0.5 mL를 분취한다. 나노입자가 공기층과 수용성 용매층의 계면에 달라붙어 있는 경우가 있는데, 이때는 이들이 시료 분취물에 섞여 들어오지 않도록 주의 깊게 채취한다.

3.7.2. 확장시험의 경우에는 매 시간마다 6 시간 동안 동일한 바이알로부터 분취하고, 스크리닝 시험의 경우에는 시작 시간(0 시간 시점, $t = 0$) 및 종료 시간(6 시간 시점)에 분취한다. 6 시간째 시료채취 전에는 시료를 원심 분리하여 사이즈가 큰(밀도와는 상관없이) 나노입자를 침강시킨 후 분취한다.

3.7.3. 6 시간에 해당하는 최종 시료를 취할 때에는 원심분리 후 용액의 표면으로부터 2 cm 아래에서 시료를 채취한다. 원심분리 시간은 1 μm 이상 크기의 입자를 침전시키는 시간으로 결정하며, 원심분리 시간의 계산을 위해 OECD 웹 사이트에서 다운 받을 수 있는 Microsoft® Excel 프로그램을 사용할 수 있다.

3.7.4. 상등액으로부터 채취한 측정분석용 시료는 9.5 mL의 초순수를 첨가하여 희석하고, 적절한 균질성을 확보하기 위해 시료 조제 및 분석 직전에 손 또는 Vortex shaker를 사용하여 격렬하게 흔들어 준 뒤 나노입자의 농도를 측정한다.

3.7.5 시료로부터 대표성이 있는 시험용 시료를 채취하기 위해 시료의 특성을 고려한 시료채취방법을 선택한다. 시료채취방법은 ISO 14488 등을 참고한다.

3.8. 시료 분석

결과의 신뢰성을 위하여 조제된 시료는 4 °C, 어두운 곳에 보관하고, 조제 후 24 시간 이내에 분석을 실시한다.

3.8.1. 원심분리 침강법

스크리닝 시험과 확장시험 단계를 포함하는 침강법의 경우 유도결합플라즈마 질량분석법(ICP-MS), 유도결합플라즈마 광학방출분석법(ICP-OES) 또는 원자흡수분광법(AAA)으로 분석한다.

- (1) 시작 시점인 0 시간과 6 시간 후에 농도를 분석하며, 6 시간 후의 시료는 원심분리하여 1 µm 이상의 입자크기를 배제(Cut-off)한다.
- (2) 0 시간 시점의 측정 농도 값에 대한 6 시간 시점의 농도 값을 백분율(%)로 나타내며, 6 시간 후 상등액의 농도 백분율이 10 % 이하인 경우 ‘저-분산성’으로 판정하며 90 % 이상인 경우는 ‘고-분산성’으로 판정한다.

3.8.2. UV-연속측정법

- (1) UV 큐벳은 표준 1 cm 큐벳을 사용하며 시료 용량은 3.5 mL로 한다. 경우에 따라 더 작은 용량의 큐벳사용도 가능하다.
- (2) 더블-빔 UV 기기를 사용하며 공시료를 바탕으로 시험물질의 흡광도(또는 혼탁도)를 측정한다. 이때 공시료는 시험조건이 달라질 때 마다 따로 조제한다. 시료측정 전 두 개의 공시료에 대해 측정하여 0 점을 잡는다.
- (3) 나노입자의 침강이 일어나지 않도록 측정시료는 조제 즉시 측정한다.
- (4) 측정 파장을 선정할 때는 나노물질의 스펙트럼 특성과 시험조건을 고려한다.
- (5) NOM 함유 조건의 시험 시에는 대상 나노물질의 광촉매활성을 고려하여야 한다. 광촉매활성을 갖는 나노물질에 대해서는 측정 파장을 380 nm 이상 또는 광촉매에 의해 흡수가 나타나는 밴드 영역 밖의 파장을 사용하여야 한다. 그렇지 않으면, UV 조사에 의한 나노물질의 광촉매 반응으로 NOM이 분해될 수 있다.

- (6) UV-VIS 측정에서는 큐벳 선택에 주의해야 한다. UV 영역의 측정이 필요하지 않은 경우에는 플라스틱 재질의 큐벳을 사용할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 스크리닝 시험에서의 결과는 0 시간 시점에서의 나노물질의 농도에 대한 6 시간 시점에서의 원심 분리한 상등액에 존재하는 나노물질의 농도를 백분율(%)로 나타내며, 확장시험에서는 X축을 샘플링 시간으로 하고 Y축을 농도 백분율(%)로 나타낸다.
- 1.2. pH 및 이온 강도에 대한 시험자료(각 3 회 실험)는 하나의 그래프에 같이 표시한다. 표준 편차는 각 측정 시점마다 3 회씩의 측정한 결과 값을 바탕으로 계산하여 그래프로 나타낸다. 0 시간 시점의 실측 농도가 이론적인 계산 농도와 차이가 날 경우에는 이를 기록한다.
- 1.3. UV-VIS를 이용하여 입자의 침강 거동을 분석한 경우 측정 파장 값(nm)을 기술하고, X축은 시간(0 시간 ~ 24 시간)을 표시하고 Y축은 측정 시점에서의 흡수 값 과 0 시간 시점에서의 흡수 값에 대한 비(A_t/A_0) 또는 백분율(%)로 나타낸다.

2. 결과의 해석

원심분리 침강법에 의한 결과는 아래와 같이 해석한다.

- 2.1. 스크리닝시험의 모든 조건에 대해 6 시간 후 상등액에 남아 있는 농도가 초기 상등액 농도의 10 % 이하($\leq 10\%$)로 감소되는 경우에는 ‘저-분산성 나노물질’로 평가한다.
- 2.2. 스크리닝 시험의 모든 조건에 대해 6 시간 후 상등액에 남아 있는 농도가 초기 상등액 농도의 90 % 이상($\geq 90\%$)으로 유지되는 경우에는 ‘고-분산성 나노물질’로 평가한다.

2.3. 이 두 물질에 해당되지 않는 나노물질은 확장시험을 실시하며 조건에 따라 분산 안정성이 달리 나타나는 나노물질로 간주한다. 분산 안정성은 특정 시험 조건을 기반으로 조건별 분산 특성으로 나타낼 필요가 있다.

저-분산성	중-저 또는 중-고 분산성	고-분산성
$\leq 10 \%$	$10 \% < X < 50 \%$ 또는 $50 \% \leq X < 90 \%$	$\geq 90 \%$

2.4. 확장시험을 실시한 경우에는 시간별 측정 지점마다의 결과를 바탕으로 밀도, 응집으로 인한 침전, 시험 과정 중 나타나는 나노물질 변화에 의한 영향, 이종(Heterogeneous) 나노물질의 침강 패턴 등의 상 분리(Phase separation) 경향 및 분리 특성(Separation characteristics) 정보에 대한 결론을 기술한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 아래 내용을 기술한다.

3.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2. 시험책임자 및 담당자 성명

3.3. 시험 나노물질에 관한 정보: 상품명, 물리-화학적 특성 지표, 측정 방법 등

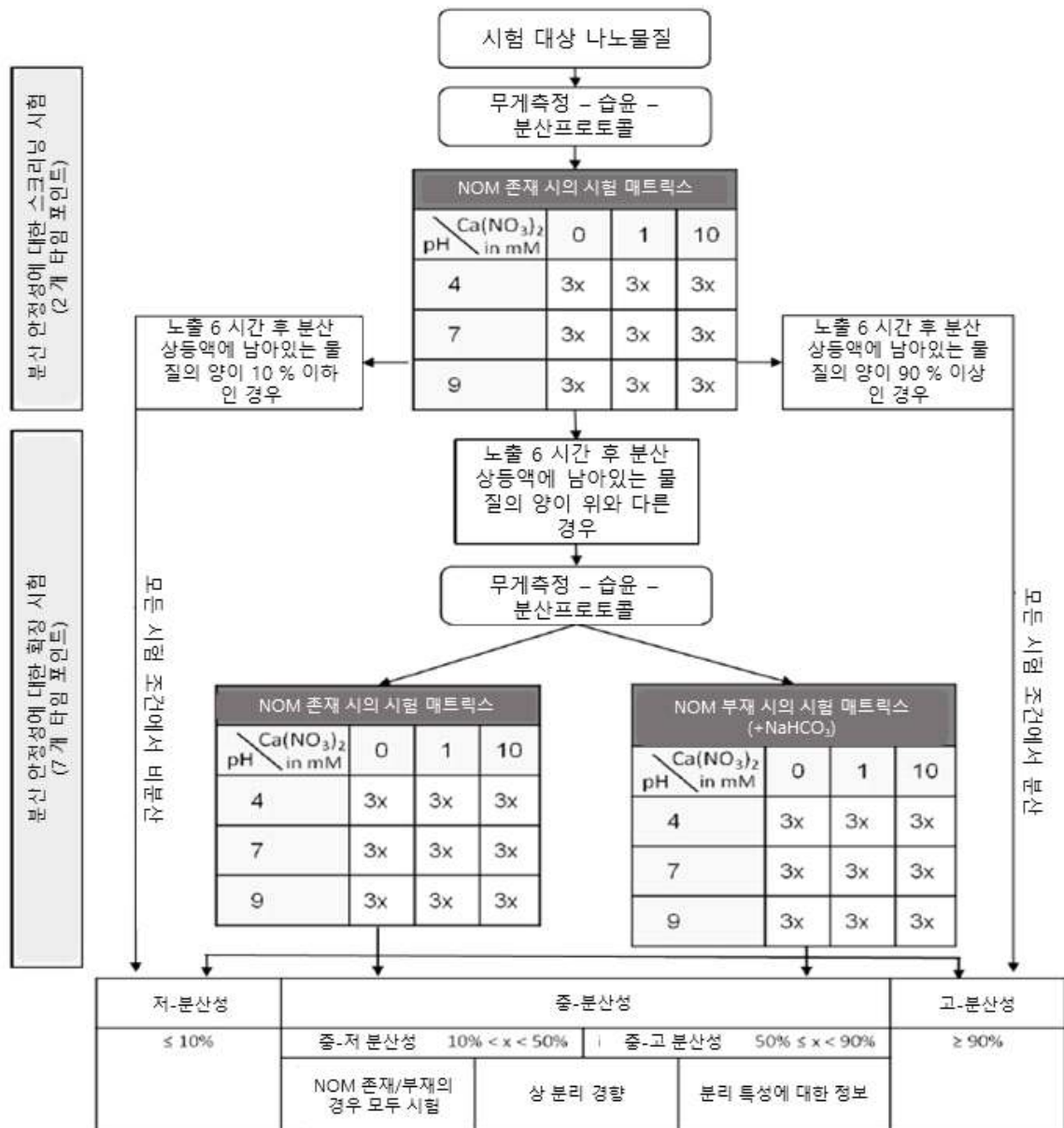
3.4. 초음파 기기의 제품 명/모델 및 보정(Validation) 결과, 전력, 진폭 및 펄스 시간, 시료량, 분산용액의 부피

3.5. 나노물질의 질량 농도 및 입자 수 농도(조제 정보 또는 물질 특성)

- 3.6. 0 시간 시점에서의 나노물질 농도의 실측 값과 계산 값의 차이(%)
- 3.7. 용기의 벽에 부착/점착 된 나노물질의 손실량
- 3.8. 분산 용액의 전해질 농도
- 3.9. NOM의 화학적 조성 및 DOC 농도
- 3.10. pH 값 및 변화 여부
- 3.11. 원심분리 조건(로터의 크기, 원심분리 회전 반경 및 샘플링 지점, rpm, 상대 원심력 및 원심분리 시간 등)
- 3.12. 측정 절차: 입자를 직접 측정한 경우인지 또는 입자를 용해시킨 후 측정한 것인지, 측정 원리, 기기 제품명 모델 및 제조자, 희석 계수, 저장 시간 등
- 3.13. 스크리닝시험: 반복시험의 수, 편차, 농도 백분율 $[(C_t/C_0) \times 100 (\%)]$ (표로 제시)
- 3.14. 확장시험: 측정시점 마다의 농도 백분율 $(C_t/C_0) \times 100 (\%)$ (그림으로 제시)과 6 시간 시점의 최종 농도 백분율(표로 제시)
- 3.15. UV-VIS를 사용하여 연속측정법으로 측정한 경우: 측정시간 대별(0 시간 ~ 24 시간) 공시료 대비 흡광도의 비 (A_t/A_0) (그림으로 제시)
- 3.16. 나노물질의 영김의 거동에 대한 해석
- 3.17. 6 시간 시점에서의 나노물질의 용해 비율(% 및 mg/L)(가능한 경우)

주 1) 스크리닝시험 및 확장시험의 설계

다음은 스크리닝 및 확장시험의 흐름도이며, 스크리닝시험의 결과 ‘고-분산성’ 또는 ‘저-분산성’ 나노물질로 분류되지 않을 경우 확장시험을 실시한다.



* Ca(NO₃)₂ 농도는 mmol/L이다.

주 2) 초음파 프로브 실험: 열량측정에 의한 음향에너지 전달량 결정

나노입자의 분산용액을 조제할 때, 입자 분포를 균일하게 만들기 위해 일반적으로 초음파처리를 한다. 이때 초음파 에너지(또는 음향에너지, Acoustic energy)가 얼마나 전달되는지는 초음파 에너지에 의해 발생하는 열량을 측정함으로써 알 수 있다. 500 mL의 초순수에 프로브를 담근 후 초음파를 실시하면서 물의 온도가 증가하는 것을 측정하고 아래 공식을 이용하여 전달된 에너지를 계산할 수 있다.

$$E = \frac{dT}{dt} m C_p$$

여기서,

dT/dt : 실험 시간($t_{\text{end}} - t_{\text{start}}$) 동안 초순수 500 mL의 온도($T_{\text{end}} - T_{\text{start}}$) 변화

C_p : 비열용량(초순수인 경우 4.184 kJ/g*K)

m : 사용한 초순수의 질량(g)

dT/dt 값은 그림 1에서 보듯이 직선 추세선의 방정식으로부터 직접 계산할 수 있다. 선형 추세선은 일반 방정식 $y = kx + b$ 로 나타낼 수 있으며, 여기서 k 값은 dT/dt 값의 직선의 기울기에 해당한다. 초음파 음향 에너지의 계산은 OECD 웹 사이트에서 Microsoft® Excel 프로그램을 다운 받아 사용할 수 있다.

30 W 또는 90 W 실험에서 2 회씩 수행한 각각의 그래프가 출발점에서 같은 온도 상에 있지 않은 것은 초순수의 시작 온도가 약간씩 다르기 때문이다. 그러나 30 W와 90 W에서 2 회 실시할 때 마다 기울기의 결과 값은 모두 유사하다. 추세선의 경사는 에너지 입력을 반영한다.

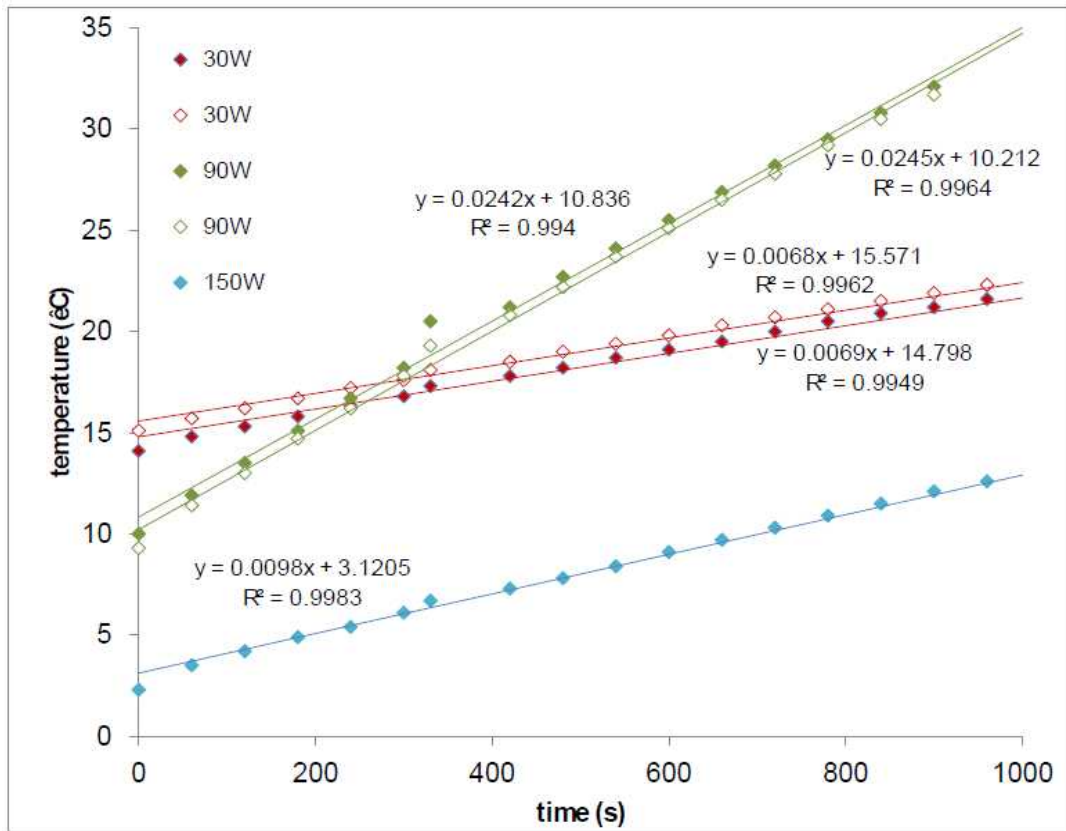
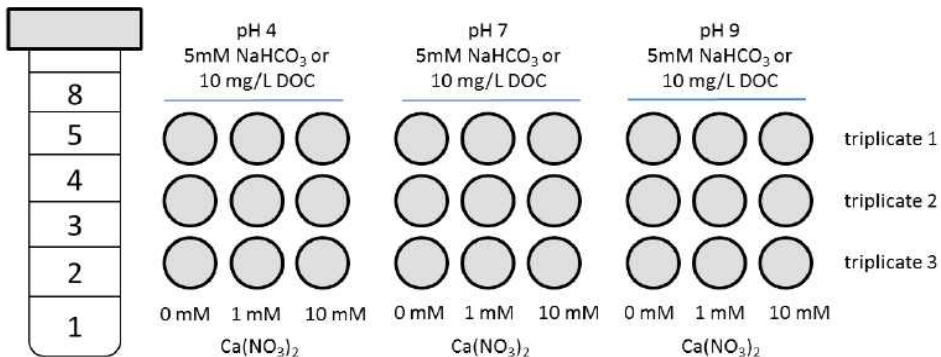


그림 1. 초음파 조사시간에 따른 온도변화

주 3) 시험대상 분산용액의 조제

1. 시험물질의 저장액을 첨가한다.
2. 물 20 mL로 희석한다.
3. 40 mL 부피에서 최종농도 5 mM이 되도록 NaHCO_3 저장액을 추가하거나 최종농도로서 10 mg/L DOC가 되도록 NOM 저장액을 추가한다.
4. 40 mL 부피에서 설정된 최종농도에 맞게 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 용액을 첨가한다.
5. 물을 ~ 35 mL까지 추가한다.
6. 소량의 HNO_3 또는 NaOH 용액으로 설정된 pH값으로 조정한다.
7. 필요한 경우 1 시간 동안 평형을 유지하고 다시 조정한다.
8. 물을 40 mL까지 채운다.



제3장 생태영향 시험분야

제1항 담수조류 성장저해시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물에 대한 영향을 평가하기 위한 방법으로 수서생물 중 담수성 미세조류 및 남조류의 성장에 대한 화학물질의 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 영향농도(EC_x , Effective concentration)

시험 조류의 성장 또는 성장률이 대조군에 비하여 X % 만큼 감소될 때 시험물질 농도이며, 일반적으로 노출시간 제시(예 : 72 h- EC_{50}). 성장률(Growth rate) 또는 수율(Yield)로부터 나온 EC값을 명확히 나타내기 위해, " E_rC "는 성장률에 대해서 사용하며, " E_yC "는 수율에 대해서 사용

2.2 표준물질(Reference substance)

독성시험이 정상적인 조건에서 수행되었는가를 확인하기 위하여 사용하는 물질이며, 표준물질로 병행시험을 한 경우에는 그 결과 보고

2.3 생물량(Biomass)

일반적으로 주어진 부피 내에서 살아있는 생물체의 건조 중량(예, mg 조류/L 시험용액). 본 시험에서는 일정 부피 당 조류의 세포수 또는 형광 방출량(Fluorescence)으로 표시할 수 있음

2.4 생장률

시험기간 중 생물량의 대수학적(Logarithmic) 증가. 즉, 단위시간 당 세포농도의 증가를 말함. 특히, 단위시간 당 자연 대수학적 생물량의 변화율을 비생장률(Specific growth rate)이라 함

2.5 수율

시험이 끝났을 때 조류의 생물량에서 시험을 시작할 때 조류의 생물량을 뺀 값

2.6 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

평균 비생장률 및 수율에 대해, 대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 처리군 농도 중 가장 낮은 농도

2.7 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

평균 비생장률 및 수율에 대해, 대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도

2.8 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표기

2.9 변동계수(Coefficient of variation)

여러 값의 표준편차를 그 평균으로 나눈 값으로 단위는 없으나 백분율로 표기하기도 함

II. 시험

1. 원리

지수생장기에 있는 조류를 여러 농도의 시험물질에 노출시킨 후 일정조건에서 배양을 하면서 조류의 성장 또는 생장률에 미치는 시험물질의 영향을 보는 것으

로 노출시간은 일반적으로 72 시간이다. 생장률 및 생장률 저해는 시간에 따른 생물량(조류) 측정값의 변화로서 나타낸다. 시험 결과는 여러 농도의 시험용액에 대해서 기록된 평균 비생장률로부터 x %의 생장률 저해를 나타내는 농도를 결정하고 $E_r C_x$ 로 표시한다. 추가적으로 수율저해($E_y C_x$)와 최소영향관찰농도, 무영향관찰농도를 결과에 포함시킬 수 있다. 시험물질의 적절한 농도범위를 알기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 본시험을 실시한다. 이 시험방법은 물에 잘 녹는 화학물질을 기준으로 하였기 때문에 시험하기 어려운 물질(용해도가 낮은 물질 등)은 별도의 적절한 절차를 적용할 필요가 있다(주 1). 원칙적으로 시험조건에서 시험물질의 수용해도 자료 및 적절한 정량분석 방법을 확보해야 한다. 또한 물질의 구조식, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 해리상수(pK_a), 옥탄올/물 분배계수(P_{ow}), 증기압 및 생분해성시험 결과 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데, 일반적으로 유리로 된 것을 사용하며, 잘 세척된 충분히 큰 것을 사용한다.

2.1.2 배양장치 : $21\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도범위에서 온도편차가 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지되고 일정 광도를 유지할 수 있는 조명장치를 보유하며, 아울러 시험용 용기를 기계적으로 진탕 또는 교반을 할 수 있어야 한다.

2.1.3 pH 측정기

2.1.4 생물량 측정 장치 : 전자입자계수장치(Coulter counter), 흐름세포분석기(Flow cytometer), 혈구계수기(Hemocytometer)가 있는 현미경, 형광광도계, 분광광도계, 비색계 등

2.1.5 조도 측정장치

2.1.6 고압증기멸균기

2.1.7 기타 일반적인 실험실 장치 및 기구

2.2 배지

2.2.1 조류의 배양은 경제협력개발기구(OECD) 시험지침에서 추천하는 배지 또는 미국환경청(EPA)에서 제시하는 배지 중 필요에 따라 선택해서 사용할 것을 권장한다(주 2, 주 3). 두 가지 배지의 초기 pH 값과 완충능력이 다르다는 점에 유의해야 한다. 이온성 물질을 시험할 때, 시험 결과가 다를 수 있으며 만일 배지 조성을 변경해서 사용할 경우에는 변경에 관한 상세한 내용과 명확한 타당성을 보고서에 포함시켜야 한다.

2.2.2 독성시험에서 시험물질 표준원액을 희석하는데 사용하는 희석수는 배지와 동일한 것을 사용한다.

2.3 시험종

시험에 적절한 조류는 아래와 같으며 한 종을 선택하여 시험하고 다른 종을 사용하는 경우에는 사용 균주와 출처를 보고해야 한다(주 4).

- (1) *Pseudokirchneriella subcapitata*(다른 이름으로 *Selenastrum capricornutum*)
ATCC 22662, CCAP 278/4, 61.81 SAG 등
- (2) *Desmodesmus subspicatus*(다른 이름으로 *Scenedesmus subspicatus*)
86.81 SAG 등
- (3) *Navicula pelliculosa* UTEX 664 등
- (4) *Anabaena flos-aquae* UTEX 1444, ATCC 29413, CCAP 1403/13A 등
- (5) *Synechococcus leopoliensis* UTEX 625, CCAP 1405/1 등

2.3.1 조류의 계대(繼代)배양

시험에 사용하는 조류는 활성유지를 위하여 적어도 2 개월에 1 회는 보존용 고체배지에 이식하여 단세포를 만들고, 이 단세포를 이용하여 액체배양을 시작하며 액체배양은 매주 계대배양 한다.

2.3.2 전(前)배양

시험에 사용할 조류를 얻기 위해 시험 시작 전에 배양하는 것을 말한다.

전배양은 시험조건과 동일한 조건에서 배양하며, 지수생장기에 이른 조류를 시험에 사용한다. 대개 시험시작 2 일 ~ 4 일 전에 전배양을 시작하는데 조류의 성장속도에 따라 전배양 기간은 적절하게 조정한다. 시험용 조류를 관찰하여 비정상적인 모양이 관찰될 때는 시험에 사용해서는 안된다.

2.3.3 초기 생물량 농도

시험을 위한 배양에서 조류의 초기 생물량은 시험군 간에 동일하게 접종되도록 주의하며, 생물량이 건조중량으로 0.5 mg/L를 넘지 않도록 한다. 배지 당 초기 접종량은 조류의 종류마다 다른데 시험기간 동안 조류가 지수적으로 증식할 수 있도록 생물량을 조절하여 접종한다. 시험 조류의 초기 접종량은 다음의 사항을 참조한다.

- | | |
|--|---|
| (1) <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> | 5×10^3 cells/mL ~ 10^4 cells/mL |
| (2) <i>Desmodesmus subspicatus</i> | 2×10^3 cells/mL ~ 5×10^3 cells/mL |
| (3) <i>Navicula pelliculosa</i> | 10^4 cells/mL |
| (4) <i>Anabaena flos-aquae</i> | 10^4 cells/mL |
| (5) <i>Synechococcus leopoliensis</i> | 5×10^4 cells/mL ~ 10^5 cells/mL |

3. 시험방법

3.1 한계시험

농도설정시험 등의 예비시험에서 시험물질의 농도가 최대 100 mg/L 또는 배지에 대한 시험물질 최대용해도에 이르기까지 어떠한 독성 영향도 나타나지 않는다면, 이 농도(100 mg/L 또는 이보다 낮은 최대용해도)에서 한계시험을 실시하며 대조군을 둔다. 처리하는 반복구 수가 최소 6 개이어야 한다는 점을 제외하고 모든 시험 조건과 타당성 기준(3.3.1항)을 한계시험에도 적용한다.

3.2 본시험

3.2.1 본시험 농도는 농도설정시험을 통해 결정할 수 있다. 농도설정시험은 100 mg/L 이내의 시험물질 농도에서 진행한다.

3.2.2 본시험은 적어도 5 개 농도 이상으로 하며 대수등간격으로 설정한다.

이때 공비는 3.2를 초과하지 않도록 하되, 그 이상 적용시에는 근거를 제시해야 한다.

3.2.3 노출농도설정 시에는 대조군과 비교하여 5 % ~ 75 % 범위의 생장저해가 관찰되도록 최저농도와 최고농도를 결정하는 것이 바람직하다.

3.2.4 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 배지로 희석하여 조제한다.

3.2.5 시험물질 표준원액은 시험물질을 배지에 녹여 조제하고 유기용매 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 적절한 물리적 방법을 이용하여 시험물질 표준원액을 조제할 수 있다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다(주 1).

3.2.6 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우는 이들 물질이 포함된 대조군을 추가로 두어야 한다.

3.2.7 배양온도는 21 °C ~ 24 °C의 온도범위에서 진탕 또는 교반하며 온도편차는 설정온도의 ± 2 °C를 유지한다.

3.2.8 백색의 연속조명에서 배양하며 조도조건은 일반적으로 $60 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} \sim 120 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 범위로 한다(이와 같은 광량은 조도계로 측정하면 약 4,440 럭스 ~ 8,880 럭스 가량이 된다). 일부 종(예, *Anabaena flos-aquae*)의 경우 조도 조건은 $40 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s} \sim 60 \mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ 범위로 한다. 플라스크를 배양장치의 임의 위치에 두고 매일 위치를 바꿀 것을 권장한다. 그리고, 배양 영역 전체에 걸쳐 평균조도로부터 ± 15 % 이내로 조도를 유지한다.

3.2.9 시험기간은 72 시간으로 하며, 생장이 느린 조류의 경우 필요하면 시험기간을 늘릴 수 있다. 최소한 24 시간, 48 시간, 72 시간 후에 세포수를 계수한다.

3.2.10 처리군 및 대조군에 대해 각각 3 개 이상의 반복구를 두도록 한다.

대조군에 대해 이상적인 반복구는 처리군에 사용하는 반복구 수의 두 배라야 한다.

3.2.11 각 플라스크의 생물량은 24 시간 마다 측정하며, 생물량은 일반적으로 세포

수로 측정한다. 전자입자계수장치와 비색계를 사용하여 세포수를 측정하는 경우, 바탕시료는 배지를 여과한 용액을 사용한다.

3.2.12 pH는 시험 시작 전과 시험 종료 후에 측정하며, 원칙적으로 시험기간 동안 대조군의 pH가 1.5 이상 변화해서는 안 된다.

3.2.13 형태학적 변화 등 처리군에서 나타나는 조류의 상태를 관찰한다.

3.3 유의사항

3.3.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군의 생물량이 시험기간 내에 최소 16 배 이상 증가해야 한다. 시험기간은 일반적으로 72 시간이며, 조류의 종류에 따라 위 조건을 만족하기 위해 시험기간을 증감(최소 48 시간 이상)할 수 있다.

- 대조군 각 반복구 구간별(0 일 ~ 1 일, 1 일 ~ 2 일, 2 일 ~ 3 일) 비생장률의 변동계수 평균이 35 %를 초과하지 않아야 한다.

- 시험기간 동안 대조군 반복구의 평균 비생장률의 변동계수가 *Pseudokirchneriella subcapitata* 또는 *Desmodesmus subspicatus*의 경우 7 %, 그 외 시험종은 10 %를 초과하지 않아야 한다.

3.3.2 육안으로 관찰하여 조류 이외의 미생물 증식이 확인되지 않아야 한다.

3.3.3 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 초기 농도와 시험기간 동안 농도 유지를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 시험기간 동안 시험물질 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 것으로 예상되는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도 그리고 예상되는 EC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.

- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 노출 시작과 종료 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

- 휘발성 물질, 불안정한 물질, 흡착성이 강한 물질 등에 대해서 시험물질 농도 변화를 파악하기 위해서 노출 기간 동안 24 시간 간격으로 분석을 실시한다.

- 농도분석에 다량의 시료가 필요한 경우, 반복구를 추가하고 시험과 같은 양의 조류를 접종하여 본시험과 동일한 시험조건으로 배양한 것을 이용한다.

3.3.4 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정된 초기농도의 $\pm 20\%$ 이내 일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그러나 농도 편차가 $\pm 20\%$ 범위를 벗어나는 경우 시험기간 동안 측정된 농도의 평균값(기하평균)을 바탕으로 결과를 산출하거나 농도감소를 평가할 수 있는 적절한 모델을 이용하여 산출한다. 시험과정 중 시험물질이 조류에 흡착되어 시험물질 농도측정이 어렵거나 적절한 평가모델을 사용하지 못하는 경우 초기 설정농도 또는 초기 측정농도를 바탕으로 결과를 산출할 수 있다.

3.3.5 표준물질을 이용한 시험은 최소한 1 년에 2 회 이상 수행한다.

시험 표준물질로는 3,5-다이클로로페놀($C_6H_4Cl_2O$, 3,5-dichlorophenol) 또는 중크롬산 칼륨($K_2Cr_2O_7$, Potassium dichromate)을 주로 사용한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 각 처리군과 대조군의 생물량(세포 농도 등)을 측정시간과 시험물질 농도별로 표로 정리한다.

1.2 농도별 처리군과 대조군의 평균 세포농도(Y축)를 측정시간(X축) 별로 그림표에 표시하여 생장곡선을 그린다.

1.3 반수영향농도(EC_{50})는 아래의 계산식을 사용하여 적당한 통계적 방법을 사용하여 구한다(주 5). 시험결과는 평균생장률과 수율에 대해 산출한다.

1.3.1 평균 생장률

시험기간 동안 일정기간의 평균 비생장률은 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$u_{ij} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \quad (\text{day}^{-1})$$

u_{ij} : 평균 비생장률(i에서 j까지의 시간)

x_i : i 시간에서의 생물량

x_j : j 시간에서의 생물량

평균 비생장률에 대한 저해율(% I_r)은 다음 식에 의하여 구할 수 있다.

$$\%I_r = \frac{u_c - u_T}{u_c} \times 100$$

% I_r : 평균 비생장률에 대한 저해율

u_c : 대조군에서의 평균 비생장률(u)의 평균값

u_T : 각 처리군에서의 평균 비생장률

각 농도별 처리군의 생장률을 구한 후, 대조군 생장률과 비교하여 각 농도별 상대적 생장저해율로 영양농도(EC_x)를 계산한다.

용매대조군이 사용되는 경우, % I_r 을 구할 때 용매대조군에 대한 u_c 를 이용한다.

1.3.2 수율에 대한 저해율(% I_y)은 다음의 식에 의하여 구할 수 있다. 수율은 시험이 끝났을 때 생물량에서 시험을 시작할 때 생물량을 뺀 값을 나타낸다.

$$\%I_y = \frac{(Y_c - Y_T)}{Y_c} \times 100$$

% I_y : 수율에 대한 저해율

Y_c : 대조군의 평균 수율

Y_T : 각 처리군의 수율

1.4 무영향관찰농도 및 최소영향관찰농도

통계적 계산이 가능한 경우, 적절한 통계방법을 사용하여 구할 수 있다. 분산분석(ANOVA), 던넛(Dunnett) 또는 윌리엄스(Williams)의 검정, 르빈(Levene)이나 바틀릿(Bartlett) 검정 등을 활용할 수 있다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 등)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

2.4 시험종 : (1) 학명 및 균주번호

(2) 입수처

(3) 배양조건

2.5 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(시험용기 및 용량, 시험종 배양, 초기 생물량, 온도, 광원의 종류 및 광도, 사용기기 등)

(3) 배지조성

(4) 배양장치

(5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항

(6) 시험용액 조제방법

(7) 생물량 측정 방법

2.6 시험결과 : (1) 최소 24 시간마다 측정한 각 시험농도별 생물량 및 측정방법

(2) 각 처리군에 대해 계산된 평균생장률 및 수율, 반복구에 대한 평균값과 변동계수

(3) 생장곡선

(4) 영향농도(EC_x)와 계산방법 (EC₁₀, EC₂₀, EC₅₀ 등)

(5) 최소영향관찰농도(가능한 경우)

(6) 무영향관찰농도(가능한 경우)

(7) 조류의 형태학적 변화

(8) 데이터의 통계처리 분석방법

(9) 시험 시작과 시험 종료시점의 pH값

(10) 보조제 사용의 타당성(해당 보조제의 사용, 선정 및 농도 설정
의 이유 등)

2.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) 참고문헌

- 1) International Organization for Standardization (1998). ISO/DIS 14442. Water quality - Guidelines for algal growth inhibition tests with poorly soluble materials, volatile compounds, metals and waster water.
- 2) OECD (2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. No. 23. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.

주 2) 조류 배양용 배지[OECD 배지]

배지원액 No.	시 약	농도
1	NH ₄ Cl MgCl ₂ ·6H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O MgSO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄	1.5 g/L 1.2 g/L 1.8 g/L 1.5 g/L 0.16 g/L
2	FeCl ₃ ·6H ₂ O Na ₂ EDTA·2H ₂ O	64 mg/L 100 mg/L
3	H ₃ BO ₃ MnCl ₂ ·4H ₂ O ZnCl ₂ CoCl ₂ ·6H ₂ O CuCl ₂ ·2H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	185 mg/L 415 mg/L 3 mg/L 1.5 mg/L 0.01 mg/L 7 mg/L
4	NaHCO ₃ (Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O)	50 g/L

- 1) 각각의 배지원액은 멸균증류수 또는 탈이온수에 녹인다.
- 2) 배지원액 2와 4는 여과막(평균 공극크기 : 0.2 μm)를 사용하여 여과하고, 배지원액 1과 3은 여과막으로 여과하거나 121 °C에서 15 분간 고압증기멸균한다. 각 배지원액의 보관은 저온(4 °C)의 암 조건에서 보관한다.
- 3) 멸균증류수 500 mL에 각각의 배지원액을 다음의 양으로 첨가한다.
 - 원액 1 : 10 mL, 원액 2 : 1 mL, 원액 3 : 1 mL, 원액 4 : 1 mL
 상기 용액에 멸균증류수를 첨가하여 최종 1000 mL를 맞추어 배지를 조제한다.
- 4) 조제된 배지의 pH는 일반적으로 8.1을 나타낸다.
- 5) 시험용 조류로 *Navicular pelliculosa*를 사용할 경우, 배지원액 4에 Na₂SiO₃·9H₂O를 첨가한다(최종배지에서의 농도가 1.4 mg Si/L 가 되도록 함).
- 6) 보존 배양용 고체배지는 상기 배지에 0.8 % 한천을 첨가한다.

주 3) 조류 배양용 배지 [EPA AAP(Algal Assay Procedure) 배지]

배지원액 No.	시 약	농도	
1	NaNO ₃	12.750 g/500 mL	
2	MgCl ₃ ·6H ₂ O	6.082 g/500 mL	
3	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2.205 g/500 mL	
4	MgSO ₄ ·7H ₂ O	7.350 g/500 mL	
5	K ₂ HPO ₄	0.522 g/500 mL	
6	NaHCO ₃	7.500 g/500 mL	
7	1) H ₃ BO ₃ 2) MnCl ₂ ·4H ₂ O 3) ZnCl ₂ 4) FeCl ₃ ·6H ₂ O 5) CoCl ₂ ·6H ₂ O 6) Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O 7) CuCl ₂ ·2H ₂ O 8) Na ₂ EDTA·2H ₂ O 9) Na ₂ SeO ₄ ·5H ₂ O	97.760 mg 207.690 mg 1.635 mg 79.880 mg 0.714 mg 3.630 mg 0.006 mg 150.000 mg 0.005 mg	1) ~ 9)의 시약을 멸균증류수에 제시된 양으로 녹여 500 mL로 맞춘다. *시약 9)의 경우는 규조류(diatom)를 배양하는 경우에만 추가로 넣는다.

1) 1 ~ 7의 배지원액 각각 1 mL씩을 900 mL의 멸균증류수 또는 탈이온수에 첨가하고 최종적으로 1 L로 맞춘다.

* 규조류를 배양할 경우에는 Na₂SiO₃ · 9H₂O 202.4 mg을 최종 조제된 1 L 배지에 첨가한다(최종배지에서의 농도가 20 mg Si/L가 되도록 함).

2) 0.1 N 또는 1.0 N의 NaOH 또는 HCl을 사용하여 pH 7.5 ± 0.1로 맞춘다.

3) 여과막(membrane filter, 0.22 µm 또는 0.45 µm)을 사용하여 멸균한다.

4) 배지의 보관은 저온(4 °C)의 암 조건에서 보관한다.

주 4) OECD(2011), Test Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. ANNEX 2. STRAINS SHOWN TO BE SUITABLE FOR THE TEST

주 5) OECD(2011), Test Guideline 201. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. ANNEX 5. DATA ANALYSIS BY NONLINEAR REGRESSION

제2항 물벼룩 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서 무척추 동물군에 대한 영향을 평가하는 방법으로 수서 무척추 동물 중 물벼룩류를 선정하여 유영능력에 대한 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 반수영향농도(EC₅₀, Median effective concentration)

일정 시험기간 동안 시험생물의 50 %가 유영저해를 일으키는 농도. 만일 다른 기준을 적용할 경우에는 근거와 함께 보고

2.2 지수식 시험(Static test)

시험기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험

2.3 반지수식 시험(Semi-static test)

시험기간 중 시험용액을 일정기간마다 전량을 교환하는 시험

2.4 유수식 시험(Flow-through test)

시험기간 중 시험용액을 연속적으로 교환하는 시험

2.5 유영저해(Immobilisation)

시험용기를 용기 내 용액이 교반되도록 가볍게 흔든 후 15 초 이내에 물벼룩 촉각(Antennae)의 움직임에 상관없이 물벼룩이 유영하지 못하는 것을 말함. 만일 다른 기준을 적용할 경우는 보고서에 명시하여야 함

2.6 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표시

II. 시험

1. 원리

물벼룩에 시험물질을 처리한 후 48 시간 동안 관찰하여 물벼룩의 50 %가 유영저해를 받는 농도(48 시간 EC₅₀)를 산출한다. 이때 시험물질의 적절한 농도범위를 알기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 본시험을 실시한다. 또한 물질의 구조식, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 해리상수(pKa), 옥탄올/물 분배계수(P_{ow}), 증기압 및 생분해성시험 결과 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

2.1.2 항온장치 : 18 °C ~ 22 °C의 온도범위를 유지할 수 있는 장치

2.1.3 pH 측정기

2.1.4 용존산소 측정기

2.1.5 경도를 측정할 수 있는 장치 및 기구

2.1.6 온도 측정기

2.1.7 자동점멸장치

2.1.8 총유기탄소(TOC) 또는 화학적산소요구량(COD)을 측정할 수 있는 장치 및 기구

2.1.9 조도측정장치

2.1.10 기타 일반 실험실 장치 및 기구

2.2 회석수 및 배지

2.2.1 물벼룩 배지는 일반적으로 경제협력개발기구(OECD) 시험지침에서 사용 권장되고 있는 배지(M4 또는 M7 배지)(주 1)을 사용하거나, 국제표준화기구(ISO) 배지(주 2)를 사용한다. 또한 탈염소 처리된 수돗물, 천연수 또는 조제수를 사용할 수 있으나 반드시 검증된 것을 사용한다(주 3).

2.2.2 금속을 포함하는 시험물질의 경우, 킬레이팅 물질을 포함하는 배지(예, M4 또는 M7 배지)는 사용하지 않는 것이 좋다.

2.2.3 배지 또는 회석수의 pH는 6 ~ 9, 경도는 140 mg/L ~ 250 mg/L (CaCO₃로서), 용존산소는 3.0 mg/L 이상 유지하도록 하며 사용하기 전에 24 시간 정도 공기를 공급한다.

2.2.4 독성시험에 사용하는 회석수는 배지와 동일한 것을 사용한다.

2.3 시험종 및 먹이

2.3.1 *Daphnia magna*를 사용하나 다른 종(예, *Daphnia pulex*)을 사용하는 경우는 근거를 제시하여야 한다.

2.3.2 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다.

2.3.3 독성시험에는 생후 24 시간미만의 어린개체를 사용한다.

2.3.4 먹이는 *Chlorella*, *Pseudokirchneriella* (= *Selenastrum*) 등과 같은 녹조류를 배양하여 공급한다. M4 또는 M7 이외의 물벼룩 배지를 사용하는 경우(예, ISO 배지), 조류 외에 효모 등의 보조 먹이를 공급할 수 있다.

3. 시험방법

3.1 한계시험

3.1.1 시험물질의 농도를 100 mg/L 또는 배지에 대한 시험물질의 최대용해도 중 낮은 농도에서 한계시험을 실시한다. 한계시험에는 20 개체의 물벼룩을 사용하는데(가능한 한 5 마리씩 4 반복구 사용) 동일한 개체수의 대조군을 동시에 둔다.

3.1.2 한계시험에서 유영저해율이 10 % 이하일 경우, EC₅₀은 한계시험 농도 이상으로 하며 10 %를 초과하는 경우 본 시험을 진행한다.

3.1.3 시험기간, 보조제 사용 등 기타 조건은 농도설정시험 또는 본시험과 동일하게 한다.

3.1.4 이상 증상이 관찰될 경우 기록한다.

3.2 농도설정시험

3.2.1 본 시험에 들어가기 전 농도설정시험을 실시하여 본 시험 농도 범위를 결정한다. 농도설정시험의 농도 범위는 시험자가 적절하게 선정한다.

3.2.2 농도설정시험에서는 각 농도 당 5 개체의 물벼룩을 사용하며 반복구는 두지 않아도 된다. 시험시간은 48 시간 또는 그 이내로 한다.

3.2.3 시험물질 표준원액은 시험물질을 희석수에 녹여 조제하고 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 적절한 물리적 방법을 이용하여 시험물질 표준원액을 조제할 수 있다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다(주 4).

3.2.4 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 희석수로 희석하여 조제한다. 시험용액 내 시험물질 농도는 희석수에서 최대용해도를 넘지 않도록 한다.

3.2.5 시험물질이 휘발성인 경우에는 밀폐된 용기에서 시험해야 하는데 이 경우 용존산소가 3.0 mg/L 미만이 되지 않도록 주의한다.

3.2.6 pH는 조정하지 않는다. 단, 시험용액의 pH가 6 ~ 9를 벗어나는 경우, 시험물질 표준원액의 pH를 시험물질을 첨가하기 전 희석수 pH에 맞게 조정 후 시험을 다시 수행한다. pH 조정은 시험물질의 농도가 변하지 않는 조건에서 물벼룩을 노출시키기 전에 염산(HCl, hydrochloric acid)과 수산화나트륨(NaOH, sodium hydroxide)을 이용하여 조정할 수 있다.

3.3 본시험

3.3.1 농도설정시험 결과에 기초하여 농도 범위를 설정하며 적어도 5 개 이상 농도(대조군 제외)의 처리군을 대수 등간격으로 정하는데, 가능한 한 공비가 2.2를 초과하지 않도록 한다. 가능한 한 최고농도에서의 유영저해율은 100 %, 최저농도에서는 유영저해가 관찰되지 않도록 한다.

3.3.2 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우는 이들 물질이 포함된 대조군을 추가로 두어야 한다. 보조제 사용과 pH 조정은 농도설정시험에서와 동일한 방법으로 한다.

3.3.3 한 농도 당 20 개체 이상의 물벼룩을 사용하며 이때 가능한 한 4 개 이상의 반복구를 둔다(예, 20 개체의 경우 5 마리씩 4개의 반복구를 사용). 시험용액의 양은 1 개체 당 2 mL 이상으로 한다(예, 한 용기에 5 개체의 경우 시험용액을 10 mL 이상으로 함).

3.3.4 시험 시작과 종료 시점에 대조군과 처리군에서의 수온, pH, 용존산소를 측정한다. 처리군의 경우, 최소한 최저농도군과 최고농도군에서는 상기 항목을 측정하도록 한다. 시험기간 동안 pH 변화폭은 1.5를 넘지 않도록 한다.

3.3.5 시험기간은 48 시간이며 24 시간 마다 물벼룩의 유영저해, 기타의 상태를 관찰하여 기록한다. 유영저해의 기준은 앞의 정의에서 명시된 방법에 따른다.

3.3.6 48 시간 후의 반수영향농도(EC₅₀)을 산출한다.

3.3.7 시험기간 동안 조명은 명암조건(명 : 암 = 16 시간 : 8 시간)을 유지하도록 한다. 시험물질이 빛에 불안정한 경우 암조건에서도 시험을 수행할 수 있다.

3.3.8 18 °C ~ 22 °C 온도 범위 내에서 시험을 실시하며 온도의 변화는 최저온도와 최고온도 사이가 2 °C 이내를 유지하도록 한다(예, 18 °C ~ 20 °C, 19 °C ~ 21 °C, 20 °C ~ 22 °C).

3.3.9 시험기간 동안에는 먹이와 공기를 공급하지 않는다.

3.3.10 시험은 일반적으로 지수식 방법을 사용하나 시험물질의 안정도가 낮은 경우, 반지수식 또는 유수식시험 방법을 사용할 수 있다.

3.3.11 시험용기는 물의 증발 및 시험용액에 먼지 등이 들어가는 것을 막기 위해 덮도록 한다. 휘발성 시험물질의 경우 시험기간 동안 용존산소는 3.4.4의 조건에 맞도록 수행한다.

3.4 유의사항

3.4.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군(보조제 대조군 포함)에서 물벼룩의 유영저해율 및 기타 이상증상은 시험 종료 시까지 10 %를 초과하지 않아야 한다.
- 시험기간 동안 대조군 및 처리군에서 용존산소의 농도는 3 mg/L 이상이어야 한다.

3.4.2 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 농도를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 시험기간 동안 시험물질 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 것으로 예상되는 경우, 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도 그리고 예상되는 EC₅₀에 가까운 농도에 대해서 노출 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.

- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 노출 시작과 종료 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

3.4.3 원칙적으로 시험결과는 측정농도로 산출한다. 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정한 초기농도의 ± 20 % 이내일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그 외의 경우 결과 산출에 대한 타당한 근거를 제시해야 한다.

3.4.4 대조군에서 물벼룩이 표면에 뜨지 않도록 한다.

3.4.5 표준물질시험은 시험조건 및 EC₅₀ 결과에 대한 신뢰성을 확인하기 위해 되도록 매월 실행하고 최소한 1 년에 2 회 이상 수행한다. 표준물질로는 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇)을 사용하며 24 시간 EC₅₀이 0.6 mg/L ~ 2.1 mg/L 범위를 권장한다.

Ⅲ. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 적당한 통계적 방법(예, 프로빗 분석 등)을 사용하여 24 시간 및 48 시간의 EC_{50} 값과 95 %에서의 신뢰 구간을 각각 구하며 보고서에는 통계적 방법이 명시되어야 한다. 얻어진 시험결과가 표준방법을 이용하여 EC_{50} 을 구하기 적절하지 않은 경우, 유영저해를 나타내지 않은 최고농도와 100 % 유영저해를 나타낸 농도의 기하평균을 구하여 EC_{50} 을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 등)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

2.4 시험종 : (1) 학명

(2) 입수처

(3) 배양조건(먹이 출처, 먹이 종류, 먹이 공급량 및 빈도 포함)

2.5 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(노출방법, 사용 개체수, 반복수, 시험 용액량, 시험용기의 형태 및 용량 등)

(3) 희석수의 상세 정보 : 수원과 수질 특성(pH, 경도, Ca/Mg 비율, Na/K 비율, 알칼리도, 전도성 등); 배지를 사용했다면 그 성분

(4) 시험기간 동안의 수질 측정값

- (5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항
- (6) 시험용액 조제방법
- (7) 시험용액에서 시험물질의 상태
- (8) 배양 조건(온도, 조도 및 광주기, 용존산소, pH 등)

- 2.6 시험결과 : (1) 대조군 및 각 시험물질 처리군에서 유영저해 또는 이상증상을 나타낸 개체수 및 그 비율
- (2) 시험과정에서 관찰된 이상증상의 내용
 - (3) 24 시간 마다 반수영향농도(EC₅₀)와 신뢰구간(예; 95 %), 통계적 과정과 통계 방법
 - (4) 농도-반응 그림표
 - (5) 시험농도(설정농도 및 측정농도)와 시험물질 농도 분석에 대한 세부내용
 - (6) 표준물질의 시험 결과
 - (7) 시험기간 동안 물리화학적 측정값(pH, 온도, 용존산소)
 - (8) 보조제 사용의 타당성(해당 보조제의 사용, 선정 및 농도 설정의 이유 등)

2.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) 물벼룩 배지(M4 및 M7) 조성

1) 배지원액 I 조제

각 배지원액 I (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액*)	농축도(배) - M4 기준	배지원액 II을 조제하기 위한 각 배지원액 I의 첨가량(mL/L, 용액*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
H ₃ BO ₃	57,190	20,000	1.0	0.25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	20,000	1.0	0.25
LiCl	6,120	20,000	1.0	0.25
RbCl	1,420	20,000	1.0	0.25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	20,000	1.0	0.25
NaBr	320	20,000	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,230	20,000	1.0	0.25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20,000	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20,000	1.0	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20,000	1.0	1.0
KI	65	20,000	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20,000	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20,000	1.0	1.0
2l Fe-EDTA 용액		1,000	20.0	5.0
Na ₂ EDTA·2H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,000 1,991	2,000 2,000	Na ₂ EDTA와 FeSO ₄ 두가지 용액을 각각 준비하여 1:1로 혼합한 후 즉시 고압 증기 멸균하여 2l Fe-EDTA 용액을 조제한다.	

*용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물을 사용한다.

2) M4 또는 M7 배지 조제

각 배지원액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액*)	농축도(배) - M4 기준	M4 또는 M7 배지**를 조제하기 위한 각 배지원액의 첨가량 (mL/L, 용액*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
1) 배지원액 II	-	20	50	50
2) CaCl ₂ · 2H ₂ O	293,800	1,000	1.0	1.0
3) MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,600	2,000	0.5	0.5
4) KCl	58,000	10,000	0.1	0.1
5) NaHCO ₃	64,800	1,000	1.0	1.0
6) Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	50,000	5,000	0.2	0.2
7) NaNO ₃	2,740	10,000	0.1	0.1
8) KH ₂ PO ₄	1,430	10,000	0.1	0.1
9) K ₂ HPO ₄	1,840	10,000	0.1	0.1
10) 혼합 비타민 원액***	-	10,000	0.1	0.1
Thiamine hydrochloride	750	10,000	혼합 비타민 원액은 증류수 1 L에 3가지 비타민을 용해시켜 조제한다.	
Cyanocobalamine (B ₁₂)	10	10,000		
Biotine	7.5	10,000		

* 용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물을 사용한다.

** 각 배지원액을 일정 비율로 섞은 후 M4 또는 M7 배지를 조제한다.

*** 혼합 비타민 원액은 사용할 양만큼 작은 용기에 나눠 냉동상태로 보관하며, 사용하기 직전에 첨가하여 배지를 조제한다.

주의) 배지를 조제할 때 염(Salts)의 침전을 피하기 위해 약 500 mL ~ 800 mL 탈이온수에 각각의 배지원액을 첨가하고 1 L로 맞춘다.

주 2) 물벼룩 배지(ISO 배지)의 조성

물질명	배지원액 농도 (g/L, 용액*)	배지 조제를 위한 배지원액의 첨가량 (mL/L, 용액*)
1) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.76	25
2) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	4.93	25
3) NaHCO_3	2.59	25
4) KCl	0.23	25

* 용액은 탈이온, 증류, 역삼투를 이용하여 얻은 순수한 물(전도도 $10 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 이하)을 사용한다.

주 3) 회석수 허용 조건

항 목	농 도
미세입자 양(Particulate matter)	< 20 mg/L
총유기탄소(Total organic carbon)	< 2 mg/L
암모니아(Unionised ammonia)	< 1 $\mu\text{g/L}$
잔류염소(Residual chlorine)	< 10 $\mu\text{g/L}$
총유기인계살충제(Total organophosphorus pesticides)	< 50 ng/L
총유기염소계살충제 및 폴리클로리네이티드바이페닐 (Total organochlorine pesticides plus polychlorinated biphenyls)	< 50 ng/L
총유기염소(Total organic chlorine)	< 25 ng/L

주 4) OECD(2000). Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures. OECD Series on Testing and Assessment. No. 23.

제3항 어류 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물에 대한 영향을 평가하는 방법으로 수서생물 중 어류에 대한 화학물질의 급성 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 반수치사 농도(LC₅₀, Median lethal concentration)

시험 생물의 50 %를 치사시키는 수용액상의 시험물질 농도이며 이때 시험기간 명기(예, 96 h-LC₅₀)

2.2. 지수식 시험(Static test)

시험 기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험

2.3. 반지수식 교환 시험(Semi-static renewal test)

시험 기간 중 일정기간(예, 24 시간)마다 시험용액을 새로 교환하는 시험

2.4. 유수식 시험(Flow-through test)

시험 기간 중 시험용액을 일정 속도로 연속적으로 흘려주어 교환하는 시험

2.5. 임계 농도(TC, Threshold concentration)

조류 또는 급성 무척추동물(예, Daphnia)의 신뢰할 수 있는 독성 자료에서 최저 EC₅₀값을 임계 농도로 정의

2.6. 전장(TL, Total length)

입 끝에서부터 꼬리지느러미의 가장 긴 부분까지의 길이로 정중앙을 따라 직선으로 측정한 길이

2.7. 단위

농도는 중량/용량(mg/L)으로 표시

II. 시험

1. 원리

어류를 일정 조건에서 시험물질에 노출시킨 후 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간 경과 시점의 치사율과 가시적 외형 이상 또는 행동학적 징후를 기록하며 어류의 50 %를 치사시키는 농도(LC₅₀)를 구한다. 어류의 100 %를 치사시키는 최소 농도와 0 %의 치사율을 보이는 최대 농도의 산출이 필수요건은 아니다.

2. 초기 고려사항

- 2.1. 시험물질의 구조식, 분자량, 순도, 물과 빛에서의 안정성, 산 해리상수(pKa), 유기탄소 분배계수(K_{oc}), n-옥탄올/물 분배계수(K_{ow}), 수용해도, 증기압 및 이분해성 시험 결과(주 2 또는 주 3) 등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다. 용해도 및 증기압을 사용하여 Henry 상수를 계산할 수 있으며, 시험물질의 증발로 인한 손실 여부를 알 수 있다. 난용성 또는 시험난해물질은 OECD 시험지침 23 번(주 4)을 참조한다.
- 2.2. 시험용액 내 시험물질의 농도 측정을 위해 검증된 분석방법을 이용하여 정확도, 정밀도 및 감도 등을 산출하고 기록하여야 한다(예, 정확도, 정밀도, 검출한계, 정량한계, 특이성, 정량 범위 등).
- 2.3. 혼합물, 미지의 또는 가변성의 물질, 복합 반응 생성물, 생물학적 물질(UVCB, Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials), 또는 다성분 물질을 시험할 경우, 그 조성을 가능한 밝혀야 한다(2.2 항 참고). 위와 같은 시험난해물질의 시험에 대한 권장사항은 OECD 시험지침 23 번에 제시되어 있으며 혼합물, 시험난해물질 등과 같이 본 시험방법을 적용하기 어려운 경우, 과학적으로 의미 있는 결과를 산출할 수 있는지에 대하여 선행 검토해야 한다.

2.4. 동물윤리와 자원의 효율적 사용을 위해 어류 급성독성시험을 수행하기 전에 우선적으로 QSAR, read-across, 어류 배아, 어류 세포주 등의 대체시험방법으로 어류 급성독성에 대한 신뢰할 만한 정보를 도출할 수 있는지 고려해야 한다. 두 번째로 임계 농도 접근법이나 본 시험방법의 한계시험을 수행하는 것으로 충분한지 고려해야 한다. 본 시험방법에 따라 어류 급성독성시험을 실시할 경우 위에 언급된 대체시험방법은 농도 설정 시험을 위해 고려될 수 있다.

3. 시험의 준비

3.1. 장치 및 기구

3.1.1. 용존산소 측정기

3.1.2. pH 측정기

3.1.3. 조도계(광도계)

3.1.4. 온도제어 장치 : 온도 편차를 $\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지 한다.

3.1.5. 경도측정장치

3.1.6. 총유기탄소(TOC) 및/또는 화학적산소요구량(COD) 측정 장치

3.1.7. 시험 용액에서의 시험 물질 농도 측정 장치

3.1.8. 수온 및 산소 함량 유지 장치

3.1.9. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기(예 : 유리, 스테인리스 등)를 사용하며, 소수성 물질에 강한 흡착력을 가지는 실리콘의 사용은 최소화하여야 한다. 특히 시험물질이 휘발성인 경우 밀폐된 용기를 사용하며 공기 공급에 주의한다.

3.1.10. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

3.2. 희석수/시험배지

3.2.1. 담수종의 경우 깨끗한 지표수, 지하수 또는 조제수(주 5)를 사용하는 것이 좋으며, 탈염소 처리한 수돗물도 사용할 수 있다. 하구종 또는 해수종의 경우 조제수를 사용하는 것이 좋으며, 증류수 또는 탈이온수에 상업 해수염(예, *Instant Ocean*, *Red Sea* 등)을 첨가하여 사용한다. 총 경도와 pH 등 수질 환경은 선택한

시험 어중에 따라 적절하게 유지되어야 한다(별첨 1, 2 참고). 모든 시약은 분석 급시약을 사용하며 증류수 또는 탈이온수의 전도도는 $10 \mu\text{Scm}^{-1}$ 이하여야 한다. 희석수는 시험에 사용하기 전 포기시켜 용존산소농도가 포화상태가 되도록 한다.

3.2.2. 시험 결과에 과도한 영향을 미치거나(예, 시험물질의 복합체형성) 생식에 부정적 영향이 미치지 않도록 관리하기 위하여, 희석수를 주기적으로 분석해야 하며, 이때 시료의 채취는 일정한 간격을 두고 이뤄져야 한다. 별첨 2의 항목에 대하여 최소 연 2회 분석을 수행하며 기준에 맞는지 확인하여야 한다. 희석수를 재순환하여 사용할 경우 암모니아(NH_3)를 정기적으로 측정해야 하며, 천연수를 사용할 경우 DOC 또는 TOC, NO_3 를 시험 전에 측정해야 한다. 탈염소수를 사용할 경우, 시험 생물의 생존·성장·생식에 영향을 주지 않는다는 것과 스트레스 징후를 보이지 않는다는 것을 입증해야 한다. 각 배치의 희석수에서 질산염과 염소의 분석을 수행하며 별첨 2의 기준에 맞는지 확인해야 한다.

3.3. 시험종

독성시험에 사용하는 어류는 쉽게 구할 수 있으며 그 외에 경제적, 생태적 요인을 고려하여 결정한다. 시험종은 별첨 1에서 추천된 종 가운데 1 종 또는 그 이상을 선정하여 시험에 사용한다. 시험에 사용하는 개체는 건강상태가 양호하며 외형상 기형이 없는 것을 사용한다.

3.3.1. 추천어종

외형상 건강하고 동일 연령의 치어(juvenile)이어야 하며(연령을 알 수 없는 경우 크기로 추정, 별첨 1 참고), 동질성 확보를 위해 동일한 출처와 동일한 군집의 어류를 사용하여야 한다.

3.3.2. 시험개체의 순화

시험에 사용하는 개체는 시험 전 최소 9 일 이상 실험실의 환경에서 적응시켜야 한다. 초기 48 시간 동안은 안정화 기간(settling-in)이며 최소 7일간의 순화 기간(acclimatisation)을 두어야 하며, 아래의 조건에 맞춰 순화시켜야 한다.

(1) 조명 : 시험중에 적합하게 선택(별첨 1 참고)

- (2) 온도 : 시험중에 적합하게 선택(별첨 1 참고)
- (3) 용존산소 : 포화산소농도의 80 % 이상
- (4) 먹이 : 시험시작 24 시간 ~ 48 시간 전까지 주 3 회 또는 1 일 1 회. 필요에 따라 여분의 먹이와 배설물을 제거하여 노폐물의 축적을 피한다.
- (5) 시험개체 : 시험개체는 순화 기간 동안 치사개체를 관찰하여 기록하고 다음의 기준에 따라 처리한다.
 - ① 7 일 안에 치사율이 10 %를 초과하면 순화 중인 시험개체 전부를 폐기한다.
 - ② 치사율이 5 % ~ 10 %이면 7 일간 더 순화한 후 판정한다. 추가한 7 일 동안 치사율이 5 %를 초과하면 순화 중인 시험개체 전부를 폐기한다.
 - ③ 치사율이 5 % 미만이면 시험에 사용한다.

단, 독성시험에 사용할 희석수와 같은 수질의 물에서 위의 조건[(1) ~ (4)]으로 지속적으로 계대사육하며 기록이 유지되는 경우에는 시험시작 직전 최근 7 일 동안 치사율이 5 % 미만인 사육군을 시험개체로 사용한다. 시험개체는 외형상 질병과 스트레스의 징후를 보이지 않고, 기형이 없어야 하며, 시험 전 14 일 이내에 질병이나 기생충 치료를 받지 않은 개체를 사용한다. 야생 개체군은 가급적 사용하지 않아야 하며, 야외 연못에서의 채집(예, 잉어, 블루길) 등 예외적인 환경에서 개체군을 취해 시험을 진행할 경우에는 질병과 기생충에 대한 치료가 필요할 수 있으므로 추가로 14 일의 순화 기간을 둔다.

4. 시험방법

4.1. 한계시험

4.1.1. 한계시험은 시험물질 유효성분으로 100 mg/L의 농도 또는 희석수에 대한 시험물질의 최대용해도 또는 임계 농도에서 실시하며 이때 대조군을 두도록 한다. 한계시험은 시험물질의 LC_{50} 이 한계시험 농도보다 크다는 것을 증명하기 위한 시험이다.

4.1.2. 96 시간 동안 관찰한다.

4.1.3. 대조군과 농도군은 각각 최소 7 마리 이상을 사용한다.

4.1.4. 한계시험 농도에서 96 시간 동안 치사개체가 한 마리도 관찰되지 않을 경우 시험물질의 LC_{50} 은 한계시험 농도 이상으로 한다. 단, 한 마리라도 치사개체가 관찰될 경우 본시험을 한다.

4.1.5. 한계시험에서 뚜렷한 이상 증상이 관찰되면 이를 기록해야 한다(4.2.9항 참고).

4.1.6. 대조군 치사율이 10 % 이하일 때 유효한 것으로 판단한다(대조군의 개체수가 10 마리 미만일 경우 1 마리 치사까지는 유효).

4.2. 본시험

4.2.1. 시험 농도 범위를 설정할 때, 대체시험법(QSAR, Read-across 또는 그룹화 추정)이나 다른 시험 데이터(어류 배아 또는 세포주를 이용한 시험)와 같은 이용 가능한 정보를 고려해야 한다. 자료가 부족하거나 신뢰도가 낮은 경우 동일종으로 간주되는 어류를 이용한 농도 설정 시험을 고려해야 한다. 또한 조류 및 물벼룩 시험에서 얻어진 임계 농도를 이용하여 농도범위를 설정할 수 있다. 어류의 100 %를 치사시키는 최소 농도와 0 %의 치사율을 보이는 최대 농도의 산출이 필수요건은 아니다.

4.2.2. 본시험에서는 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 정하며 공비는 2.2를 초과하지 않도록 한다. 가능한 1.6 ~ 1.8의 공비를 사용한다.

4.2.3. 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 희석수로 희석하여 조제한다.

4.2.4. 시험물질 표준원액은 적절한 물리적 방법(예, 교반 및 초음파)을 이용하여 조제하고 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제는 원칙적으로 사용해서는 안 된다. 시험물질이 불안정하거나 난용성 물질인 경우, OECD 시험지침 23 번에 따라야 한다. 보조제 사용이 불가피한 경우, 독성이 낮은 것을 선택하고 필요한 최소한의 양을 사용하며 보조제 사용의 타당성을 제시하여야 한다. 보조제 농도는 시험용액에서 100 mg/L 또는 0.1 mL/L를 초과하지 않도록 하며 모든 농도군에서 동일 농도의 보조제가 첨가되어야 한다.

4.2.5. 시험물질 표준원액의 조제에 보조제가 사용될 경우, 보조제가 포함된 대조군(용매 대조군)을 두어야 하며 이 경우 희석수 대조군은 생략할 수 있다. OECD

시험지침 23 번에서는 독성이 낮은 용매(acetone, ethanol, methanol, tertiary-butyl alcohol, acetonitrile, dimethyl formamide, dimethyl sulfoxide와 triethylene glycol)의 사용을 권장하고 있으나, 인체 건강 및 안전상의 이유로 dimethyl formamide와 dimethyl sulfoxide는 피해야 한다.

4.2.6. 대조군과 각 시험 농도군당 7 마리 이상의 시험개체를 사용하며 반복구는 두지 않는다.

4.2.7. 96 시간 동안 매일 관찰하여 치사개체와 독성증상을 기록하고 치사개체는 관찰 즉시 제거한다. 치사의 판정은 시험개체를 건드려도 움직이지 않거나 아가미 호흡이 중단된 경우를 치사로 판정한다.

4.2.8. 시험시작 후 24 시간이 지나기 전에 최소 2 번 관찰해야 하며, 최소 3 시간의 간격을 두어야 한다. 노출 2 일차부터는 모든 수조를 하루에 두 번(가능한 이른 아침과 늦은 오후) 관찰해야 한다.

4.2.9. 관찰 시간대별 치사율과 뚜렷한 이상 증상(평형상실, 유평이상, 비정상적 호흡, 비정상적 피부색소침착, 안구돌출증)을 기록하며, 추가적인 임상 증상도 가능한 경우 기록한다(주 1).

4.2.10. 시험기간 동안 24 시간마다 대조군과 시험 농도군에서 수온, pH, 용존산소를 측정한다. 노출 시작 시 사용할 희석수에서 경도(시간의 경과에 따른 안정성이 입증되지 않은 경우)와 TOC를 측정한다. 반지수식 시험에서는 교환 전후에 용존산소, pH, 온도를 측정한다.

4.2.11. 시험 종료 시 시험 농도군의 개체는 안락사를 진행한다. 반면 대조군의 시험개체는 안락사를 진행할 필요는 없으나 다른 시험에 사용해서는 안 된다.

4.2.12. 시험 시작에 앞서 순화 수조에서 10 마리 이상의 개체의 크기(무게와 전장)를 측정해야 하며, 이 개체는 시험에 사용하지 않는다. 시험 시작 일주일 이전에 측정되었다면, 개체의 크기를 확인하기 위해 시험 종료 시점에 대조군 개체의 측정이 필요하다. 무게는 희석수를 미리 넣어 무게를 측정한 용기에 개체를 넣어 측정할 수 있다. 전장은 사진 이미지를 통해 측정할 수 있으며, 권장 크기는 별첨 1에 나타내었다.

4.3. 유의사항

4.3.1. 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 대조군에서 시험개체 사망률은 시험 종료 시점에 10 %를 넘지 않아야 한다.
- 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이상이 되도록 한다. 시험물질 농도 분석 결과 시험물질 농도를 현저하게 감소시키지 않는 경우 포기를 할 수 있다.
- 시험물질의 농도를 측정한다(4.3.8항 참고).
- 타당성 기준과 시험 방법에서 벗어난 부분이 있으면 보고해야 한다. 연구 결과 및 타당성과 관련하여 편차의 이유와 결과를 보고서에 기술한다. 타당성 기준에서 사소한 편차가 관찰되는 경우 시험 데이터의 신뢰성을 검토해야 하며 이러한 사항을 보고서에 기록한다.

4.3.2. 담수종을 이용하는 경우, 시험개체 무게와 시험용액의 비율은 지수식과 반지수식의 경우 시험용액 1 L 당 시험개체 최대투입량이 0.8 g을 넘지 않도록 한다. 유수식의 경우는 24시간 동안 시험용액 1 L 당 시험개체 최대 투입량이 0.5 g을 넘지 않도록 한다. 어떠한 경우라도 투입량은 시험용액의 5 g/L를 넘지 않도록 한다.

4.3.3. 시험은 pH를 조절하지 않고 수행한다. 그러나 이온화 물질의 경우, 독성이 강한 구조(형태)를 띠는 pH에서 본시험을 수행해야 하며, 이때 pH는 6.0 ~ 8.5의 범위(별첨 1)를 벗어나지 않아야 한다. 화학물질 자체가 시험용액의 pH를 변화시켜 6.0 ~ 8.5 범위를 벗어나게 하는 경우, 표준원액의 pH를 6.0 ~ 8.5의 범위 내에 있도록 조절해야 한다. 특별한 규정에 의해 요청된 경우를 제외하고, 시험은 pH를 조절하여 수행되며 pH 조절을 하지 않는 병행시험은 필요하지 않다. pH의 조절은 염산(HCl, Hydrochloric acid)과 수산화나트륨(NaOH, Sodium hydroxide)을 사용하도록 한다.

4.3.4. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암)으로 한다. 실험실의 조도는 $10 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s} \sim 20 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, 540 lux ~ 1,000 lux, 또는 50 ft-c ~ 100 ft-c로 유지한다.

4.3.5. 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않는다.

4.3.6. 시험중의 적정온도 범위 내(별첨 1)에서 ± 1 °C로 온도를 유지한다.

4.3.7. 시험도중 시험개체의 행동에 영향을 미칠 수 있는 과도한 진동 또는 소음과 같은 방해요소를 피하도록 한다.

4.3.8. 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 농도를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다.

- 독성시험기간 동안 최소한 최고 시험농도와 최저 시험농도, 그리고 예상되는 LC₅₀에 가까운 농도에 대해서 시험물질의 농도를 측정한다. 시험용액이 안정하지 않은 경우 조제 즉시 농도를 측정한다.

- 지수식 시험에서 시험 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.

- 반지수식 시험에서 시험 시작과 종료, 최소한 첫 번째 교체주기 시작과 종료 시점에 시험물질의 농도를 측정한다.

- 유수식 시험에서 독성시험 시작 전에 시험 농도의 분석을 수행하여 농도 확인 및 유지 여부를 확인해야 한다. 분석 빈도는 시험물질의 안정성의 근거로 결정한다. 시험물질의 농도가 유지되며 설정 농도의 80 % 이상 유지되어야 한다. 농도가 20 % 이상 감소될 것으로 예상될 경우에는 모든 시험 농도를 측정하고, 분석 횟수를 추가한다(예, 48 시간 추가 분석).

- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 지수식, 반지수식 및 유수식 시험에 대해 위에서 정한 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

4.3.9. 원칙적으로 시험결과는 측정농도로 산출한다. 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정한 초기농도의 ± 20 % 이내일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 그 외의 경우 결과 산출에 대한 타당한 근거를 제시해야 한다.

4.3.10. 시험 실시 기관은 시험의 신뢰성을 확인하기 위해서 정기적으로 표준물질을 가지고 시험을 실시하도록 한다. 표준물질로는 중크롬산칼륨(K₂Cr₂O₇), 3,5-디클로로페놀(C₆H₄Cl₂O), 황산구리(CuSO₄) 등을 사용한다.

Ⅲ. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 시험결과는 표 형식으로 요약해야 하며, 사용한 시험 개체수, 관찰 시간대별 대조군 및 각 시험농도군의 치사율과 치명적인 독성 영향이 포함되어야 한다. 4.2.9항에 설명한 임상 징후의 보고는 필수적이며, 추가적인 임상 증상도 가능한 경우 기록한다(주 1). 한계시험 결과에 대한 농도-반응 그래프나 통계적 처리는 필요치 않다. 한계시험을 제외하고 각 노출 기간 동안의 누적 치사율은 로그 스케일을 적용하여 농도에 대하여 표시한다.
- 1.2. LC₅₀값 추정에 사용되는 통계적 방법은 부분적 치사 (치사율 > 0 % 및 치사율 < 100 %)가 관찰된 농도군의 수에 따라 달라진다. 실험결과에서 부분 치사를 보이는 농도군의 수가 최소 2개 이상인 경우, LC₅₀값과 95 % 신뢰구간 및 기울기는 프로빗 또는 로직모델 등 고전적인 최대우도법과 같은 통계 방법을 이용하여 계산하여야 한다. 부분 치사가 있는 농도군이 하나만 있거나 아예 없는 경우에는 LC₅₀값을 추정하기 위해 스피어만-카버 방법, 이항법, 이동평균법, 그래픽 방법과 같은 다양한 기술을 사용할 수 있다. 이와 같은 비-고전적인 방법은 정확한 LC₅₀값을 추정 가능하게 하며 고전적인 프로빗 최대우도법으로 분석할 수 없는 어류 급성 연구 결과를 평가하는데 유용하다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

- 2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지
- 2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 2.3. 시험물질 :

- 단일 성분 물질(mono-constituent substance)
 - (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물

(4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

- 다성분 물질(multi-constituent substance), UVCBs, 혼합물

(1) 가능한 자체 화학적 식별 이름 (단일 성분 물질 참고)

(2) 구성 요소의 물리화학적 특성

(3) 구성 요소의 성분

2.4. 시험중 : (1) 학명 및 계통

(2) 입수처

(3) 전장, 무게

(4) 순화방법, 순화기간의 관찰결과, 사육방법(먹이 종류, 먹이량, 먹이 공급 빈도 등)

2.5. 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

(2) 시험절차 및 관련 세부사항(노출방법, 사용 개체수, 반복수, 시험 용액량 등)

(3) 희석수의 수질특성(pH, 경도, 수온 등) 및 별첨 2의 적합 여부

(4) 시험기간 동안 24 시간마다 개별 수조의 시험용액의 용존산소농도, pH, 수온 측정값(반지수식의 경우 시험용액 교환 전후 모든 항목을 측정)

(5) 시험원액 및 시험용액 조제방법

(6) 시험 용액 성상(appearance)과 용존 농도를 확인하기 위해 사용한 방법(예, 원심분리 또는 여과)

(7) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항

(8) 대조군과 농도군에 사용된 각 시험개체 수

2.6. 시험결과 : (1) 관찰시간대별 각 노출농도에서의 누적치사율

(2) 대조군에서의 치사율

(3) 24 시간, 48 시간, 72 시간, 96 시간의 LC₅₀ 값과 95 % 신뢰구간

- (4) 노출 96시간에서의 농도-반응 곡선의 기울기
- (5) 노출 종료 시 농도-치사 곡선의 그래프
- (6) 4.2.9항에 나열된 뚜렷한 이상증상 및 설명; 추가적인 임상 증상
도 가능한 경우 작성
- (7) 시험과정에서 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 요인
- (8) 사용된 통계 방법 및 데이터 처리에 대한 설명 (예, 프로빗 분석, 로직
모델, LC 값의 산술 또는 기하 평균, 시간 가중 평균)
- (9) 시험방법에서 이탈된 부분, 연구결과의 편차에 관한 상세 설명

주 1) OECD(2019). Guidelines for testing of chemicals No. 203 : Fish Acute toxicity test.

주 2) OECD(1992). Guidelines for testing of chemicals No. 301 : Ready Biodegradability.

주 3) OECD(2006). Guidelines for testing of chemicals No. 310 : Ready Biodegradability,
CO2 in sealed vessels.

주 4) OECD(2019). Guidance Document on Aqueous-Phase Aquatic Toxicity Testing
of Difficult Test Chemicals. OECD Series on Testing and Assessment No. 23
(Second Edition).

주 5) ISO(1996). International Standards. Water quality - Determination of the
acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [Brachydanio rerio
Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]. ISO 7346-3: Flow-through method.

(별첨 1) 추천어종의 전장 및 시험 조건

추천어종	온도 (℃)	염도 (‰)	pH	경도 (mg/L CaCO ₃)	광주기 (hours light)	전장 (cm)
제브라피시 <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	21 ~ 25	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	1 ~ 2
북미산 잉어 <i>Pimephales promelas</i> (Fathead Minnow)	21 ~ 25	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	1 ~ 3
잉어 <i>Cyprinus carpio</i> (Carp)	20 ~ 24	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	2 ~ 4
송사리 <i>Oryzias latipes</i> (Japanese medaka)	23 ~ 27	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	1 ~ 2
구피 <i>Poecilia reticulata</i> (Guppy)	21 ~ 25	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	1 ~ 2
블루길 <i>Lepomis macrochirus</i> (Bluegill)	21 ~ 25	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	1 ~ 3
무지개송어 <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Rainbow trout)	10 ~ 14	< 0.2	6.0 ~ 8.5	40 ~ 250 가급적 < 180	12 ~ 16	3 ~ 6
큰가시고기 <i>Gasterosteus aculeatus</i> (Three-spined stickleback)	13 ~ 19	0 ~ 35	6.0 ~ 8.5	40 ~ 7,500	12 ~ 16	1 ~ 2
양두모치 <i>Cyprinodon variegatus</i> (Sheepshead minnow)	23 ~ 27	15 ~ 35	6.0 ~ 8.5	3,000 ~ 7,500	12 ~ 16	1 ~ 2
유럽바다농어 <i>Dicentrarchus labrax</i> (European sea bass)	18 ~ 22	15 ~ 35	6.0 ~ 8.5	3,000 ~ 7,500	12 ~ 16	4 ~ 8
참돔 <i>Pagrus major</i> (Red sea bream)	18 ~ 22	30 ~ 35	6.0 ~ 8.5	3,000 ~ 7,500	12 ~ 16	2 ~ 4

- 수질의 염도 편차는 ± 1 ‰로 유지한다
- 독성시험은 성적 성숙이 이루어지기 전인 치어 단계의 어류로 시험을 해야 한다. 치어가 아닌 개체를 사용하는 경우에는 발달단계(juvenile, sub-adult, adult stage)와 근거를 함께 보고해야 한다.

(별첨 2) 회석수/시험수의 물리화학적 수질기준

항목	최고 농도
입자상 물질	5 mg/L
총유기탄소(TOC)	2 mg/L
비이온화된 암모니아 (NH ₃)	1 µg/L
질산염 (NO ₃)	< 9 mg/L
잔류염소	10 µg/L
총유기인농약	50 ng/L
총유기염소농약(PBCs 포함)	50 ng/L
총유기염소	25 ng/L
알루미늄(Al)	1 µg/L
비소(As)	1 µg/L
크롬(Cr)	1 µg/L
코발트(Co)	1 µg/L
구리(Cu)	1 µg/L
철(Fe)	1 µg/L
납(Pb)	1 µg/L
니켈(Ni)	1 µg/L
아연(Zn)	1 µg/L
카드뮴(Cd)	100 ng/L
수은(Hg)	100 ng/L
은(Ag)	100 ng/L
화학적 산소요구량(COD)	5 mg/L

- 높은 농도의 총유기탄소(TOC)는 다량의 용존유기탄소(DOC)를 나타내며, 잠재적으로 시험화학물질(유기물질, 금속화합물)과 결합하여 시험물질의 독성과 생물학적 가용성을 감소시킨다. DOC는 공극이 0.45 µm인 필터를 통과하는 유기 분자를 의미한다.
- 민감한 담수어류의 보호를 위하여 NO₃-N의 최대 농도는 2 mg/L가 적절하며, 이는 NO₃의 농도 8.85 mg/L와 동일하다.
- 구리 파이프 또는 구리(합금)가 포함된 혼합물로 인하여 어류가 치사할 수 있다(*Pimephales promelas* LC₅₀ : 0.073 mg/L).
- COD 또는 TOC는 측정한다.

제4항 조류 번식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 조류(鳥類)의 번식에 미치는 영향을 평가하는데 목적이 있다. 화학물질에 노출된 조류의 생존능력, 산란능력, 부화된 새끼에 대한 영향을 관찰함으로써 번식독성을 평가한다.

2. 정의

2.1. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 최대 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3. 기본사료(Basal diet)

번식에 필요한 공급량(성체조류에 해당) 또는 초기공급량(새끼조류에 해당)으로 조류의 영양을 충족

2.4. 알 세트(Egg set)

껍질두께를 측정하기 위해 사용하거나 금이 가 있는 알을 제외하고 인큐베이터 안에 있는 알 또는 산란한 모든 알

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 조류 섭취독성 값은 번식독성을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 섭취독성 값이 본 시험에서와 동일종인 경우는 시험물질의 농도설정에도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 안정성 등도 시험에 유용한 정보이다.

2.2. 시험동물

2.2.1. 종의 선택

하나 이상의 시험 종을 사용할 수 있다. 시험의 목적에 따라 종을 선택하는데 일반적으로 권장하는 종은 청둥오리(Mallard duck; *Anas platyrhynchos*), 북미산 메추라기(Bobwhite quail; *Colinus virginianus*), 일본산 메추라기(Japanese quail; *Coturnix coturnix japonica*)이다. 시험 종은 사육하기 쉽고, 공급이 용이해야 한다. 상기 종과 다른 종을 사용하는 경우에는 사용에 대한 타당한 이유를 제시하도록 한다. 시험조류는 구입 또는 실험실에서 사육한 것을 사용할 수 있으며 질병이나 부상이 없어야 한다. 모든 시험조류는 혈통을 명확히 알고 있는 동일 모집단에서 얻어진 것을 사용한다. 시험용 청둥오리 및 북미산 메추라기는 같은 종의 야생 조류와 생김새가 유사해야 한다.

표 1. 권장하는 성체 조류의 조건

조류 종	시험개시기의 연령	시험기간 동안 나이 범위	한쌍*당 우리의 최소 바닥면적
청둥오리	9 개월 ~ 12 개월	± 2 주	1 m ²
북미산 메추라기	20 주 ~ 24 주	± 1 주	0.25 m ²
일본산 메추라기	**	± 1/2 주	0.15 m ²

* 크기가 더 큰 군을 사용하는 경우, 바닥공간도 보다 넓도록 한다.

** 시험에 사용하기 전, 종의 변이성을 줄이기 위해, 메추라기는 증명된 번식가능 조류(breeder)를 사용하도록 한다(표 3 참조).

2.2.2. 거주 및 사육 조건

실내에서 조류를 사육할 적절한 시설이 필요하다. 사육 시설에는 통풍, 온도, 습도 및 빛 조절을 위한 장치들이 포함되어야 한다. 인공조명은 가시광선과 유사해야 하고, 자동으로 조절되도록 한다. 새벽 및 해질 무렵에 15 분 ~ 30 분 동안 전환기간(Transition period)을 갖는 것이 좋다. 성체 조류는 $22^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 및 상대습도가 50 %에서 75 %인 통풍이 좋은 시설에서 사육하도록 한다. 표 1은 각 실험동물의 종류에 따른 특별한 사육 조건을 제시하고 있다.

시험물질이 사료에 함유되지 않는다는 점을 제외하고는 순화기간 및 시험기간 동안의 환경조건은 동일해야 한다. 화학물질 사용 혹은 약물치료는 가능한 한 피해야 하지만, 사용했을 경우에는 보고하도록 한다. 조류의 행동변화에 영향을 줄 수 있는 방해요인은 제거한다. 알과 어린 조류를 위한 환경조건은 표 2에 제시되어 있다. 사육우리의 온도는 바닥에서 2.5 cm ~ 4 cm 높은 곳에서 측정한다.

표 2. 알과 새끼조류를 위한 권장 환경조건

	온도(°C)	상대습도(%)	방향전환 여부
청둥오리			
저장	14 ~ 16	60 ~ 85	선택
배양	37.5	60 ~ 75	예
부화	37.5	75 ~ 85	아니오
새끼(1 주)	32 ~ 35	60 ~ 85	-
새끼(2 주)	28 ~ 32	60 ~ 85	-
북미산 메추라기			
저장	15 ~ 16	55 ~ 75	선택
배양	37.5	50 ~ 65	예
부화	37.5	70 ~ 75	아니오
새끼(1 주)	35 ~ 38	50 ~ 75	-
새끼(2 주)	30 ~ 32	50 ~ 75	-
일본산 메추라기			
저장	15 ~ 16	55 ~ 75	선택
배양	37.5	50 ~ 70	예
부화	37.5	70 ~ 75	아니오
새끼(1 주)	35 ~ 38	50 ~ 75	-
새끼(2 주)	30 ~ 32	50 ~ 75	-

2. 시험방법

2.1. 원리

조류는 적어도 20 주 동안 다양한 농도의 시험물질이 함유된 사료를 먹는다. 광 주기 조절을 통해 조류가 알을 낳도록 한다. 10 주 동안 산란한 알을 수거해 인공 배양시킨 후, 새끼 조류에게 14 일 동안 사료를 준다. 성체 조류의 사망, 산란능력, 금이 간 알, 알 껍질의 두께, 생존능력, 부하능력 및 새끼 조류에 대한 영향을 대조군과 비교한다.

2.2. 시험

2.2.1. 대조군 및 시험물질 처리군에 사용되는 조류는 무작위로 분배한다. 대조군 및 처리군의 조류는 최소한 2 주 동안 시설물과 기본섭식에 순화시킨다. 순화기간 동안 성(암·수)에 관계없이 3 % 이상 사망하거나, 쇠약해진 경우, 시험 조류의 모집단은 사용하지 않도록 한다.

2.2.2. 시험기간 동안, 적어도 3 개 이상 농도의 시험물질을 함유하는 사료를 조제하도록 한다. 시험물질의 농도는 조류섭식독성에서의 독성값을 토대로 하는 것이 좋다. 최고농도는 섭식독성에서 10 % 사망농도의 1/2에 가깝도록 선정한다. 농도간격은 최고농도에서 등비급수로 낮게 정한다(예, 최고농도의 1/6, 1/36). 최대 농도는 1,000 mg/L 이하가 되도록 한다.

2.2.3. 시험물질을 함유하는 사료는 일정농도의 시험물질과 조류 사육용 기본 섭식 사료를 균일하게 혼합하여 만든다. 균일한 혼합을 위해 조류에 독성이 낮은 용매를 사용할 수 있다. 용매는 사료무게의 2 %를 초과하지 않도록 한다. 대조군의 사료에도 동일한 용매를 사료에 첨가해야 한다. 일반적으로 물, 옥수수기름 또는 시험에 널리 사용되는 다른 용매들을 사용할 수 있다. 새끼조류 사료에는 시험물질 혹은 용매를 첨가하지 않는다.

2.2.4. 시험조류는 암·수 한 쌍으로 시험하거나, 수컷 1 마리당 암컷 2 마리(메추라기의 경우) 또는 3 마리(청둥오리의 경우)를 배치하는 그룹으로 시험을 할 수 있다. 타당한 사유를 제시하면 다른 성비의 배치도 가능하다.

- 2.2.5. 대조군 및 처리군 조류는 동일한 환경조건으로 배치된다. 쌍으로 하는 시험에서는 대조군 및 처리군당 최소한 12 개의 조류용 우리를 사용하도록 한다. 그룹으로 시험하는 경우, 대조군 및 처리군당 최소한 8 개(청둥오리의 경우) 및 12 개(메추라기의 경우)의 조류용 우리를 각각 사용한다.
- 2.2.6. 시험조류가 시험물질을 함유한 사료에 노출되면서 시험이 시작된다. 시험기간 동안, 성체 조류는 시험물질에 계속 노출되도록 한다. 시험기간 동안 태어난 새끼 조류의 사료에는 어떠한 시험물질도 첨가하지 않도록 하며, 항상 깨끗한 물을 공급하도록 한다.
- 2.2.7. 시험이 인공적으로 만든 실내 환경에서 이루어지는 경우, 시험 시작 후 8주 동안 동일한 조명조건(예, 매일 7 시간 ~ 8 시간의 조명)으로 유지한다. 이때, 암조건을 중단하지 않도록 한다. 그 후, 조류가 알을 낳기 적합한 조건을 만들어 주기 위해 매일 16 시간 ~ 18 시간을 광주기로 조명한다. 보통 광주기가 시작된 지 2 주 ~ 4 주 후, 알을 낳기 시작한다.
- 2.2.8. 시험이 실외환경에서 이루어지는 경우, 시험 종과 동일한 야생종이 부화하는 시기와 동일한 기간에 맞춰 시험을 시작하도록 한다. 시험 조류는 정상적으로 알을 낳기 시작하기 전, 최소한 10 주 동안 시험물질을 함유한 사료에 노출되도록 한다.
- 2.2.9. 위의 두 환경 조건으로 최소한 8 주 동안 시험을 지속한다(보통 알을 낳기 시작한 후 10 주 동안의 기간을 권장한다).
- 2.2.10. 사료에 함유된 시험물질 농도가 시험시작부터 첫째 주에 설정농도의 80 % 이하로 떨어지지 않도록 한다. 사료에 함유된 시험물질의 안정도를 적절하게 설명할 수 없는 경우(시험물질이 불안정하다고 판단되는 경우), 시험 첫째 주 동안, 최초 사료와 시험물질을 혼합한 직후와 4 시간 이내에 최고농도 및 최저농도의 시험물질을 함유한 사료를 분석한다. 이때 사료에 함유된 시험물질 농도가 설정농도의 80 % 이내인 경우, 더 이상의 분석은 실시하지 않고, 설정 농도가 유지될 수 있도록 시험용 사료를 자주 새로 조제하도록 한다.
- 2.2.11. 사료에 함유된 시험물질 농도가 분석 후 설정농도의 80 % 이하인 경우, 초

기 농도를 증가시키거나, 시험용 사료를 자주 바꾸면서 실제 농도가 유지 되도록 한다. 이때 시험시작 둘째 주에는 목표치인 80 %에 도달했는지를 알아보기 위해 추가분석을 실시한다.

2.2.12. 사료에 함유된 시험물질의 안정도와 관계없이 우리 내의 사료는 최소한 1 주일에 1 회는 교환하는 것이 바람직하다. 사료를 매일 새롭게 바꿔줄 필요가 있을 정도로 시험물질이 불안정하면, 본 시험에는 적절하지 않다.

2.2.13. 알을 낳기 시작하면, 매일 알을 수거하여 시험용 우리에 넣어 표시를 한다. 알을 저장한 후, 매주 혹은 2 주에 한 번씩 배양 및 분화를 위해 분리한다. 배양 하기 전에는 알에 금이 갔는지를 확인하도록 한다. 깨진 알은 배양해서는 안 된다. 6 일 ~ 11 일 후에 생존능력을 확인하고자, 배양을 위한 알들을 촛불로 비추어 재차 관찰한다.

2.2.14. 최소한 우리 당 2 개의 알을 지정해서 껍질 두께를 측정하도록 한다. 금이 생긴 알은 측정할 필요는 없지만, 그 수는 기록한다. 알을 꺼내서 세척하고 건조시킨 후, 알을 세워 허리둘레의 넓은 부위(횡단)에서 일정한 3 ~ 4 개의 점을 표시하고 껍질 두께를 각각 측정한다.

2.2.15. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산 메추라기 알을 각각 시험 23 일째, 21 일째, 16 일째에 배양조건에서 부화조건으로 이동시키도록 한다. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 알의 부화는 보통 각각 25 일 ~ 27 일째, 23 일 ~ 24 일째, 17 일 ~ 18 일째에 종료된다.

2.2.16. 부화한 새끼는 각 부화된 우리에 넣거나, 혹은 개별로 표시한 후 동일한 우리에 함께 넣는다. 부화한 새끼는 14 일 동안 시험물질이 함유되지 않은 사료를 공급하도록 한다. 조명은 낮을 기준으로, 새벽 및 해질 무렵에 15 분 ~ 30 분 동안 전환기를 갖는 것이 좋다. 타당한 사유가 있는 경우, 다른 조명 방식도 사용할 수 있다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 시험 종료 시 대조군의 사망률은 10 %를 초과하지 않도록 한다.

- 2.3.2. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군이 우리에서 14 일간 생존한 조류의 평균수는 최소한 각각 14 마리, 12 마리, 24 마리어야 한다.
- 2.3.3. 청둥오리, 북미산 메추라기, 일본산메추라기 대조군 알 껍질의 평균 두께는 최소한 각각 0.34 mm, 0.19 mm, 0.19 mm이어야 한다.
- 2.3.4. 권장한 농도범위에서 최대농도에서 번식에 대해 어떤 영향도 발견되지 않은 경우, 무영향관찰농도(NOEC)는 최대농도 이상으로 보고할 수 있다.
- 2.3.5. 시험기간 동안, 사료에 함유된 시험물질의 농도가 유지되고 있다는 것을 증명할 수 있어야 한다. 설정농도가 최소한 80 % 이상 유지되도록 한다.

2.4. 관찰항목

시험기간 동안, 다음 관찰을 해야 한다.

- 2.4.1. 사망 및 중독 증상을 매일 관찰한다.
- 2.4.2. 성체조류의 체중을 측정한다(시험시작 및 시험 종료 시).
- 2.4.3. 새끼 조류 몸무게를 측정한다(부화 14 일 후).
- 2.4.4. 시험기간 동안 1 주 또는 2 주 간격으로 성체 조류의 사료소비량을 측정한다.
- 2.4.5. 부화한 후 1 주 및 2 주 후에 새끼 조류의 사료소비량을 측정한다.
- 2.4.6. 모든 성체 조류에 대해 조직병리학적 관찰을 실시한다.

선택한 조직에 대한 잔류물 분석은 $\log P_{OW}$ 의 값이 3.0을 넘는 시험물질에 대해서 특히 유용할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4. 시험동물 : 종의 학명, 조류의 계통, 시험시작의 조류의 연령(주 또는 달), 시험 조류의 공급처, 기타 시험동물에 관한 사항

2.5. 시험조건

(1) 사육조건 : 시험기간 동안 우리의 형태, 크기, 재질, 온도 및 상대습도, 광주기, 통풍, 기타 모든 변화

(2) 기본섭식 사료의 공급원, 성분 및 성분분석 자료(단백질, 탄수화물, 지방, 칼슘, 인 등), 사용된 모든 첨가물 및 용매에 대한 설명

(3) 시험용 사료 : 조제방법, 사용된 설정농도 및 농도 개수, 시험물질과 사료의 혼합방법, 사료에서의 시험물질 실측을 위해 사용한 분석방법, 시험용 사료의 공급횟수 및 조제 주기, 용매(사용된 경우), 사료 저장조건 등

(4) 시험 조류의 순화방법, 우리에서의 시험 조류의 성비 및 배치방법

(5) 우리 당 조류 수, 처리군 및 대조군당 반복군 수

(6) 알 및 조류에 대한 확인 방법

(7) 온도, 습도 및 방향전환 빈도를 포함한 알 저장, 배양 및 부화 조건

(8) 대조물질로 사용된 살충제 이름, 시험용 농도조제 방법(사용한 경우)

2.6 시험결과

(1) 독성증상, 영향을 받은 개체 수, 발생빈도, 독성이 나타난 기간

(2) 성체 및 새끼 조류의 사료소비량 및 체중

(3) 조직병리학적 증상에 대한 설명

(4) 조직 내 잔류물질 분석결과(수행한 경우)

(5) 알 생산, 생존능력, 부화능력(정상적인 부화 포함), 생존한 새끼 조류, 알 껍질 두께(시험기간 동안 매주 각 농도 및 우리 별 결과를 표로 작성)

- (6) 통계 분석방법 및 결과 해석
- (7) 무영향관찰농도 및 통계적으로 유의한 모든 영향수준
- (8) 시험결과에 영향을 줄 수 있는 관련 사항
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

표 3. 번식과 관련된 요인들에 대한 표준 값*

번식관련 요인	청둥오리	북미산 메추라기	일본산 메추라기
알 생산 - 우리 당 낳은 알 수(10 주)	28 ~ 38	28 ~ 38	40 ~ 65
금이 간 알의 %	0.6 ~ 6	0.6 ~ 2	-
생존능력 (알 세트 당 생존한 배아 %)	85 ~ 98	75 ~ 90	80 ~ 92
부화능력(알 세트 당 부화율 %)	50 ~ 90	50 ~ 90	65 ~ 80
14 일간 생존한 부화된 새끼 (%)	94 ~ 99	75 ~ 90	93
우리 당 14 일간 생존한 새끼 조류의 수	16 ~ 30	14 ~ 25	28 ~ 38
알 껍질 두께(mm)	0.35 ~ 0.39	0.19 ~ 0.24	0.19 ~ 0.23

* 상기 값들은 전형적인 값들이나, 반드시 모든 시설을 대표하지는 않는다.

대조군 조류의 값들이 상기 수치들과 일치하지 않거나, 유사하지 않은 경우, 시험에 대해 잠재적 문제점이 발생할 수 있으므로 시험절차에 대한 조사가 필요하다.

제5항 지렁이 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 토양을 수송매체로 하는 육생생물에 의한 기초단계시험으로서 토양을 이용한 지렁이의 단기간 노출을 통하여 화학물질의 유해성을 스크리닝하는데 목적이 있다.

(가) 시험용 지렁이를 사용한다.

(나) 난용성 물질도 가능하나 수용성인 물질에 가장 용이하게 적용된다.

(다) 본 시험법의 적용대상은 주로 화학물질이며 공장폐수, 표면수 및 지하수 등에도 확대 적용될 수 있다.

(라) 본 시험법에는 '필터페이퍼를 이용한 독성시험'과 '인공토양을 이용한 독성시험'을 수록함에 따라 선택하여 시험할 수 있으나 전자는 화학물질의 스크리닝을 위한 시험이며, 화학물질의 유해성심사, 위해성평가 등 평가를 목적으로 하는 경우는 후자의 시험에서 얻어진 독성값을 사용하여야 한다.

2. 정의

2.1 반수치사농도(LC₅₀)

시험생물의 50 %를 사망하게 할 것으로 추정되는 시험물질의 치사농도(Lethal concentration)를 말하며, 시험기간을 명기(예 : 14 d-LC₅₀)

2.2 대조 물질

시험에 사용하는 생물의 화학물질에 대한 반응이 일정한가를 확인할 목적으로 사용하는 화학물질로 염화아세트아미드(CH₂ClCONH₂)를 주로 사용

2.3 농도단위

농도는 토양 건조중량에 대한 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표기

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

- 1.1.1 시험용기 : 화학적으로 불활성인 재질로 수용량에 따라 적절한 크기의 용기 (1 L 비이커 등)
- 1.1.2 온도제어 가능한 배양장치 : $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도범위에서 설정한 온도를 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지하고 조도 400 렉스 ~ 800 렉스로 조정 가능한 배양기 또는 실험실
- 1.1.3 pH측정기
- 1.1.4 수분측정기
- 1.1.5 소형 믹서
- 1.1.6 필터페이퍼 : $80\text{ g/m}^2 \sim 85\text{ g/m}^2$, 두께 약 0.2 mm의 중급 이상의 재질
- 1.1.7 소형 바이알 : 바닥이 납작한 원형으로서 높이 8 cm, 지름 3 cm가량 되는 것

1.2 인공토양의 준비

지렁이 생육에 적당한 토양을 사용하며 다음과 같은 인공토양을 사용할 수 있다.

- 1.2.1 10 % Sphagum으로 만든 진흙(pH 5.5 ~ pH 6.0에 가까울 것. 식물이 남아 있어서는 안 되며, 분말상이고 건조시킨 것)
- 1.2.2 20 % 카올린 점토(카올린 함량은 가능한 30 % 이상 일 것)
- 1.2.3 70 % 공업사(잔모래인 경우 $50\text{ }\mu\text{m} \sim 200\text{ }\mu\text{m}$ 의 입자경인 것이 50 % 이상 점유할 것)
- 1.2.4 pH는 탄산칼슘을 가하여 6.0 ± 0.5 로 조정한다.

위의 건조 성분을 정확한 비율로 혼합하여 대형 실험용믹서 또는 소형 전기시멘트믹서로 완전히 혼합한다. 소량의 시료를 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 건조하여 재 칭량하고 수분함량을 측정한다. 전체의 수분함량이 건조중량의 약 35 %가 되도록 이온교환수를 가해 완전히 혼합한다. 제조한 인공토양에 압력을 가해도 물이 나와서는 안 된다. 실제 시험에 사용하는 인공토양은 상기 조건을 만족하는 토양으로 적절하게 제조하여 사용하면 된다.

1.3 필터페이퍼의 준비

인공토양 대신에 필터페이퍼를 사용하여 독성시험을 할 수 있다.

1.3.1 필터페이퍼를 이용한 시험은 수용성이 높은 물질, 유기용매 등을 시험물질로 할 때 적당하다

1.3.2 필터페이퍼를 바이알의 바닥 크기로 잘라 바이알 안 바닥에 깔아준다.

1.4 시험용 지렁이

장려하는 시험 종은 *Eisenia foetida* (Michaelson)이다. 이 종은 유기물이 풍부한 토양에 살며, 화학물질에 대한 감수성은 실제 토양에 살고 있는 종과 비슷하다. 3 주 ~ 4 주 안에 부화하고 20 °C에서 7 주 ~ 8 주 지나면 성숙한다. 다산하며 성숙한 지렁이는 1 주일에 2 개 ~ 5 개의 난포(cocoon)를 낳고 각 난포에서 몇 마리씩의 지렁이가 태어난다. 이 지렁이는 시판되며 각종 유기 폐기물로 쉽게 번식시킬 수 있다. 동일계통의 지렁이를 사육장으로부터 보급 받아야 한다. *Eisenia foetida*에는 두 아종 있으며 *E. foetida foetida*는 환절부위에 특징적인 선(Stripping)모양이 있으나, *E. foetida andrei*는 선모양이 없고 붉은 색을 띤 얼룩무늬가 있다. 시험에는 가능한 한 *E. foetida foetida*를 사용하는 것이 좋다.

시험에 사용하는 지렁이는 다음 조건을 만족해야 한다.

- (1) 지렁이는 생후 2 개월 이상 된 성숙한 것으로 체중이 300 mg ~ 600 mg이 되어야 한다.
- (2) 시험개시 전 1 일 이상 인공토양에서 사육하되 먹이는 주지 않는다. 필터페이퍼로 시험을 할 경우, 시험 전 3 시간 동안 증류수로 적신 필터페이퍼에 지렁이를 두어 장 안의 내용물이 스며 나오게 하고, 지렁이를 물로 씻은 후 물기를 말려 시험에 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

지렁이를 시험조건 하에서 여러 농도의 시험물질에 일정기간 노출하여 그 사망수를 시험기간 동안 측정하여 반수치사농도를 산출하며, 그 외의 독성영향도 관찰한다. 인공토양을 이용한 시험이 주로 사용되며 필터페이퍼를 이용한 시험은 화학물질의 독성을 스크리닝하는데 적용할 수 있다. 시험물질의 적당한 농도범위를 설정하기 위해 농도설정시험을 실시하고 그 결과에 기초하여 농도단계를 설정하여 본시험을 한다.

2.2 농도설정시험

2.2.1 인공토양을 이용한 독성시험

2.2.1.1 농도설정시험을 위한 시험물질의 농도는 1,000 mg/kg, 100 mg/kg, 10 mg/kg, 1 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.01 mg/kg을 기본으로 하여 단계적으로 정한다.

2.2.1.2 시험용 지렁이는 1 개의 시험용기에 10 마리를 사용한다.

2.2.1.3 각 농도 당 처리군 및 대조군마다 1 개의 시험용기를 사용한다.

2.2.1.4 시험물질이 수용성인 경우, 증류수에 녹이고 인공토양과 잘 혼화한다.

2.2.1.5 시험물질이 난수용성인 경우, 시험용액은 시험용 지렁이에 대해 독성이 낮은 유기용매, 계면활성제, 분산제 등의 보조제를 사용하여 조제해도 무방하다. 이 경우 각 처리군은 일정농도의 보조제를 포함하도록 하며 동일한 농도의 보조제 대조군을 설정한다. 또한 보조제의 농도가 100 mg/kg을 넘지 않도록 한다.

2.2.1.6 pH는 조정하지 않고 시험을 한다.

2.2.1.7 시험용기마다 습중량 750 g의 시험토양(시험물질 + 인공토양)을 유리용기에 넣고, 인공토양에 1 일 이상 순화시킨 지렁이를 빠른 속도로 증류수에 씻은 후 시험 농도 당 10 마리 이상을 토양표면에 놓는다. 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 덮어 건조를 막는다.

2.2.1.8 20 °C ± 2 °C범위로 온도를 설정하고, 각 처리군 및 대조군의 온도를 설정온도의 ± 2 °C 이내로 유지한다.

2.2.1.9 조명은 시험기간 중 점등한다.

2.2.1.10 그 밖에 노출기간 및 관찰 방법은 본시험에서의 방법과 동일하게 한다.

2.2.2 필터페이퍼를 이용한 독성시험

2.2.2.1 필터페이퍼가 깔려 있는 각각의 바이알에 농도별로 1 mL의 시험용액을 첨가한다. 시험용액의 pH는 사전에 측정해 기록해둔다.

2.2.2.2 대조군의 경우 1 mL의 증류수를 첨가하거나 보조제를 일정량 첨가한다 (처리군의 최고농도에 첨가된 유기용매, 분산제 등의 양과 동일량).

2.2.2.3 바이알을 수평으로 천천히 회전시키면서 시험용액이 첨가된 필터페이퍼를 건조시킨다.

2.2.2.4 바이알 내의 필터페이퍼가 건조된 후, 1 mL의 증류수를 첨가하여 적신다.

2.2.2.5 0.001 mg/cm² ~ 1.0 mg/cm²의 범위에서 농도를 선택하여 지령이를 투입(1 개체/1 바이알)하여 농도설정시험을 한다. 반복구의 유무 또는 그 수는 적절히 판단하여 정한다.

2.2.2.6 각각의 바이알은 캡 또는 플라스틱 필름을 이용하여 밀봉한다.

2.2.2.7 그 밖에 노출기간 및 관찰방법은 본시험에서의 방법과 동일하게 한다.

2.3 본시험

2.3.1 인공토양을 이용한 독성시험

2.3.1.1 농도설정시험 결과, 즉 14 일간 대부분의 지령이가 생존한 최고농도 및 14 일간 대부분의 지령이가 사망한 최저농도를 고려하여 5 단계 이상의 농도를 대수등간격으로 설정한다.

2.3.1.2 각 시험농도군 및 대조군마다 시험용기 4 개, 즉 4 개 이상의 반복구를 둔다. 시험기간은 14 일로 한다.

2.3.1.3 시험지령이의 생사 및 그 상태(토양 속으로 들어가는 상태, 건드렸을 때의 반응, 채색 등)를 시험개시 후 7 일째 및 14 일째에 관찰하여 기록한다. 시험지령이의 머리부분에 기계적 자극을 주어도 반응이 없을 때를 사망으로 간주한다. 사망한 지령이는 즉시 제거한다.

2.3.1.4 시험개시 전과 시험종료 후에 시험농도군 및 대조군의 토양의 pH와 수분을 측정한다.

2.3.1.5 시험개시 및 시험종료 시 생존한 지렁이의 체중을 측정한다.

2.3.1.6 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.3.2 필터페이퍼를 이용한 독성시험

2.3.2.1 농도설정시험 결과를 바탕으로 5 개 이상의 농도를 대수등 간격으로 정한다.

2.3.2.2 농도 당 10 반복구 이상을 두며, 20 반복구 까지 둘 수 있다.

2.3.2.3 한 바이알에 1 개체 이상을 넘지 않도록 한다.

2.3.2.4 시험기간은 48 시간이며, 필요한 경우 72 시간까지 연장할 수 있다.

2.3.2.5 시험기간 동안 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 범위로 온도를 설정하고, 각 처리군 및 대조군의 온도를 설정온도의 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 이내로 유지한다.

2.3.2.6 시험은 조명을 두지 않고 어둠 속에서 진행한다.

2.3.2.7 시험지렁이의 머리부분에 기계적 자극을 주어도 반응이 없을 때를 사망으로 간주한다.

2.3.2.8 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.4 시험상의 유의 사항

대조군의 사망률은 시험종료 시 10 %를 넘지 않아야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 사용한 지렁이의 사망률(시험물질 농도 당)을 계산하여 얻은 값을 적당한 통계적 방법(*pribit*법 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀)와 이의 95 % 신뢰한계를 산출한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭 (일반명, 상품명 등 명기)

(2) 구조식 (시정식, 분자식 명기)

(3) 입수경위, 제조년월일

(4) 순도 또는 불순물

(5) 물에 대한 용해도

(6) 휘발성 또는 증기압

(7) 기타 물성에 관한 자료

2.4 시험지령이 : (1) 시험용 지령이의 종명, 계통 및 입수경위

(2) 적응결과, 사육방법 (먹이종류, 섭식량, 급식빈도 등)

(3) 평균길이, 평균체중

2.5 시험조건 : (1) 시험개시일, 시험 종료일 및 시험기간

(2) 시험온도, 조도 및 광원의 종류

(3) 바이알의 규격 및 재질

(4) 필터페이퍼의 규격, 재질

(5) 인공토양의 성상 (공급원 또는 강열감량, 유기탄소, 총 질소, 등)

(6) 시험토양의 상태, 보관방법, 인공토양에 대한 시험물질 첨가방법

(7) 시험용기 당 시험토양의 양, 시험지령이 수

(8) 시험농도군 설정근거 및 각 시험농도군 시험물질의
농도(설정치 및 실측치)

(9) 시험용액의 pH

2.6 시험결과 : (1) 각 시험농도군 및 대조군의 각 관찰기간에 있어서의 사망개체수와 누적사망률

(2) 시험기간 중의 각 시험농도군 및 대조군의 pH, 수분의 측정치 (인공토양 시험의 경우)

- (3) 시험개시 및 종료 시 생존한 지렁이의 체중
- (4) 시험 종료시 농도-사망곡선그래프
- (5) 각 관측시의 LC_{50} 값과 그 산출방법 및 95 % 신뢰구간
- (6) 사망률 0 %의 최고농도 및 사망률 100 %의 최저농도
- (7) 기타 관찰된 영향 및 그 영향이 인정된 농도

제6항 육생식물 생장시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 토양에 1 회 처리한 고형 또는 액상의 시험물질이 여러 종의 육상식물의 발아 및 초기 성장에 대한 영향을 평가하는데 목적이 있다.

(1) 많은 육생식물에 대해 적용된다.

(2) 본시험법의 적용대상은 주로 화학물질이나 공장폐수, 표면수 및 지하수 등에 확대 적용할 수 있다.

2. 정의

2.1 EC₅₀

시험생물의 성장변화가 대조군의 성장에 비하여 50 %가 되는 시험물질의 농도

2.2 LC₅₀

시험생물의 발아율 변화가 대조군의 발아율에 비하여 50 %가 되는 시험물질의 농도

2.3 발아

토양표면에 싹이 출현하는 것

2.4 대조물질

시험에 사용이 장려되는 대조물질은 없으나 대조물질을 사용하여 시험하였을 경우에는 그 결과를 표시하여야 함

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 온실 또는 식물육성 상자와 같은 적절한 설비

1.1.2 식물 용기 : 구멍이 없는 플라스틱제 또는 유리제를 사용한다.

1.2 토양

무균토양을 사용할 필요는 없다. 토양은 굵은 파편을 제거하기 위해 체(0.5 cm)로 쳐야한다. 탄소함량은 1.5 % (유기물로서 3 %)를 넘어서는 안 된다. 세립자 (20 μm 이하) 함유율은 10 % ~ 20 % 범위여야 하며 pH는 5.0 ~ 7.5 범위여야 한다. 시험물질을 토양전체에 균일하게 분산할 수 있다면 어떤 방법을 사용하더라도 관계없다. 계면활성제는 사용하지 않도록 한다.

1.3 시험식물

시험에는 다음의 3 부문 중 적어도 하나씩 선택하여 최저 3 종을 사용하여야 한다. 시험종 선택에 있어 이론적 근거가 정당화되면 다른 종을 사용해도 좋다.

부문		시험종
호밀풀	ryegrass	<i>Lolium perenne</i>
벼	rice	<i>Oryza sativa</i>
귀리	oat	<i>Avena sativa</i>
밀	wheat	<i>Triticum aestivum</i>
옥수수	sorghum	<i>Sorghum bicolor</i>
겨자	mustard	<i>Brassica alba</i>
서양유채	rape	<i>Brassica napus</i>
무우	radish	<i>Raphanus sativus</i>
순무우	turnip	<i>Brassica rapa</i>
중국배추	chinense cabbage	<i>Brassica campestris var.chinensis</i>
살갈퀴	vetch	<i>Vicia sativa</i>
녹두	mung bean	<i>Phaseolus aureus</i>
붉은토끼풀	red clover	<i>Trifolium pratense</i>
호로파	fenugreek	<i>Trifolium ornithopodioides</i>
레타스(양상치)	lettuce	<i>Lactuca sativa</i>
갯	cress	<i>Lepidium sativum</i>

2. 시험방법

2.1 원리

여러 농도의 시험물질을 혼입한 토양에 종자를 심는다. 발아한 싹의 수를 기록하고 대조군의 싹이 50 %가 발아하고 나서 적어도 2 주 후에 식물을 잘라 중량을 측정한다.

2.2 시험

2.2.1 온도, 습도, 광조건은 시험기간 중 각 식물종의 정상생육을 유지하는데 적절하여야 한다.

2.2.2 무작위로 불럭을 나눠 1 개의 대조군과 3 개의 농도군으로 시험한다. 시험물질을 토양에 혼입하고 24 시간 내에 각 군당 적어도 5 개의 종자를 뿌린다. 각 시험에 사용하는 종자는 동일한 크기여야하며 종자를 물을 담가 팽윤화시켜서는 안된다.

시험물질은 다음의 방법으로 토양에 혼입한다.

- (1) 시험물질을 휘발성 용매에 용해한다.
- (2) 용액을 모래와 섞는다.
- (3) 용매를 증발시키는 동안 모래슬러지 상태로 방치한다.
- (4) 모래를 토양과 섞는다.
- (5) 대조군을 포함한 모든 시험농도군을 일정한 토양 모래 비율로 한다.

2.2.3 처리농도는 건조토양 1 kg에 대해 시험물질을 0.0(대조군) mg, 1.0 mg, 10.0 mg, 100.0 mg으로 한다. 그 후 종자를 뿌린다.

2.2.4 시험에 사용하는 포트나 용기는 선택한 종의 생장을 억제하지 않도록 충분히 클 필요가 있다.

2.2.5 필요에 따라 식물에 물을 주며 시험은 대조군의 싹이 50 % 발아할 때 부터 14 일 후에 종료한다.

2.3 시험상의 유의사항

2.3.1 대조군의 최저 80 %의 종자가 정상적으로 싹이 발아하여야 한다.

2.3.2 대조군의 싹은 시험기간 동안 정상적으로 성장해야한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1 군당 발아한 식물의 수를 기록하고, 1 군당 평균중량을 측정(수확직후의 습중량 또는 70 °C에서 건조한 후의 건중량)하여 식물당 평균중량을 표기한다. 시험물질의 발아에 대한 영향을 LC₅₀로 나타내고 생장에 대한 영향은 EC₅₀으로 표시한다.

2. 시험결과의 보고

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭 (일반명, 상품명등 명기)

(2) 구조식 (시정식, 분자식 명기)

(3) 입수경위, 제조년월일

(4) 순도 또는 불순물

(5) 물에 대한 용해도

(6) 휘발성 또는 증기압

(7) 기타 물성에 관한 자료

2.4 시험생물 : (1) 시험에 사용한 식물의 종/아종 명

(2) 종자의 입수경위

(3) 종자의 중량과 발아능력

2.5 시험조건 : (1) 시험개시일, 시험종료일 및 시험기간

(2) 포트나 용기의 크기 및 토양의 양

(3) 시험물질의 토양혼입방법

- (4) 생장조건(조도, 광주기, 주야의 온도, 산수기록)
- (5) 시험설비의 타입(화이트트론, 온실, 육성상자)
- (6) 토양의 성질(pH, 유기물함량, 20 μm 이하의 입자비율, 멸균여부)

2.6 시험결과 : (1) 농도-영향 상관관계 그래프로 표기

- (2) 발아에 대한 LC_{50} 값
- (3) 생장에 대한 EC_{50} 값
- (4) 시험종료 후 대조군 및 시험군의 사진등
- (5) 시험지침에 이탈한 사항

제7항 식물에 대한 만성독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 시험물질이나 토양이 일정 시험조건에서 고등식물의 발아, 생장 및 번식능력에 영향을 미치는지 평가하기 위해 실시한다. 토양의 품질, 특히 식물의 서식지로서 토양의 기능과 토양 내 화학물질의 만성독성을 평가하는데 목적이 있다. 본 시험은 고등식물에 대해 적용하며 휘발성물질의 경우 헨리상수나 공기/물 분배계수가 1 이상인 경우 혹은 증기압이 25 °C에서 0.0133 pa 초과되는 경우에는 본 시험을 적용 할 수 없다.

2. 정의

2.1 인공토양(Artificial soil)

모래(Sand mixture), 고령토(Kaolinite), 이탄(Peat) 및 탄산칼슘의 혼합물로 조성한 토양. 석영사, 암면(Mineral wool), 질석 또는 다른 합성물질은 사용 할 수 없음

2.2 생물중량(Biomass)

어린 싹, 꽃, 종실험의 총 중량. 생물량은 식물당 건조중량 또는 용기 당 건조중량으로 표현

2.3 대조토양(Control soil)

대조물 및 배지로 사용되는 오염되지 않는 토양. 인공 또는 자연, 표준 또는 기준토양 중 한 가지가 사용되며 시험토양과 대조토양 사이 영양수준에 차이를 보이면 용량-반응 패턴에 영향을 미침. 대조토양이 시험토양보다 영양이 풍부하면 위양성이 초래되고, 대조토양이 시험토양보다 영양이 부족하다면 낮은 토양-혼합비에서 호메시스(Hormesis)가 예상되거나 역 용량-반응관계가 보일 수 있음

2.4 영향농도(ECx)

대조군에 비하여 x %만큼 감소될 때, 주어진 종말점에서 시험용 화학물질의 농도(질량비) 또는 시험토양의 백분율(질량비)이며, mg/kg 로 나타냄

2.5 발아(Emergence)

종자로부터 어린 식물이 출현하는 것. 대조군 용기와 시험군 용기에서 출현하는 유식물의 백분율로 나타냄

2.6 호메시스(Hormesis)

높은 농도에서 독성을 보이는 화학물질이나 토양혼합물이 저농도에서는 유익한 영향을 나타내는 현상이며 본 시험의 경우 발아율, 생장, 생존 등이 개선되는 현상을 말함

2.7 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군에서 관측된 값과 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 토양 내 시험물질의 가장 낮은 농도

2.8 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도(질량비) 또는 토양 혼합비

2.9 기준토양(Reference soil)

시험 토양과 유사한 특성(영양분의 농도, pH, 유기물함량 및 토성 등)을 가진 오염되지 않은 토양. 일반적으로 토양이 채취된 장소 인근에서 채취된 오염되지 않은 토양

2.10 토양혼합비(Soil mixture ratio)

기준토양 또는 대조토양에 대한 시험 토양의 건조무게와 기준토양의 건조무게의 비율

2.11 표준토양(Standard soil)

그 주요 특성(pH, 토성, 유기물함량 등)이 알려진 범위 내에 있는 야외에서 수집된 토양이나 인공토양

2.12 유식물(Seedling)

종자식물의 종자에서 발아한 어린식물. 대부분은 자엽 또는 제 1엽이 잔존하는 기간을 지칭

2.13 어린 싹(Shoot)

식물의 줄기와 그것에 달린 잎의 총체로, 뿌리를 제외한 식물체

2.14 종실험

주로 콩과 작물에서 종실험을 포함하거나 싸고 있는 꼬투리

2.15 보수력

토양입자의 흡착력, 물 분자간 응집력 등의 흡인력에 따른 토양 수분함량을 질량 백분율 또는 용량 백분율 등으로 표시한 것으로, 토양 수분장력 또는 매트릭 퍼텐셜(Metric potential)에 따라 그 값이 다름

2.16 심지

흡인도구로 사용되며, 침투작용이나 모세관 현상으로 수분을 빨아들이는 기구

2.17 솟아내기

발아 후, 조밀한 곳이나 불필요하거나 세력에 비하여 많은 열매의 일부 개체를 제거해 주는 것을 의미

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험식물

1 종의 단자엽식물과 1 종의 쌍자엽식물종들을 동시에 시험한다. 단자엽 식물 종으로 귀리(*Avena sativa*), 쌍자엽식물종으로 순무(*Brassica rapa*)가 추천된다. 특정지역에서 생태적 또는 경제적으로 중요한 의미가 있는 식물 등 다른 종들이 선택 될 수도 있는데 이런 종 선택 시에는 시험보고서에 그 근거를 제시해야 한다.

1.2 토양

1.2.1 일반사항

시험토양은 망의 크기가 4 mm ~ 5 mm 인 체(sieve) 로 체질을 하여 굵은 입자를 제거한 후, 전체적으로 혼합 시켜준다. 토양은 시험식물에 독성을 일으키지 않을 범위의 pH를 가져야 하며, 순무와 귀리의 경우 pH 5.0 ~ pH 7.5 이어야 한다. 필요 시 토양은 체질하기 전에 열을 가하지 않고, 공기로 건조시킨다. 시험토양은 약 4 °C에서 용기에 되도록 단기간 보관한다.

1.2.2 시험토양

시험에 사용된 모든 토양에 대해 보수력을 측정하여 심지를 통해 충분히 물을 빨아 올리는지 확인한다. 파악해야 하는 시험토양의 특성은 다음과 같다.

- (1) 토성
- (2) pH
- (3) 염분함유도
- (4) 유기탄소 함량
- (5) 칼륨, 질소, 인의 총합량 및 용해도

1.2.3 대조토양

무균토양을 사용할 필요는 없다. 인공의 기준토양이나 표준토양이 대조 물질로 사용된다. 기준토양은 오염된 지역 근처의 오염되지 않은 곳에서 얻고, 오염물에 대한 화학적 분석을 수행한다. 독성 오염물이 함유되었거나 비정상적

토양 특성을 배제할 수 없다면 표준토양을 우선적으로 사용한다. 표준토양은 오염되지 않은, 영양분이 과도하지 않은 천연 또는 인공토양으로 한다. 천연토양의 유기물 함량은 5 % 이하, 20 μm 이하 미세입자는 20 %는 초과하지 않도록 한다. 인공토양의 성분은 건조중량에 기초하여 물이끼 이탄 10 % 고령토 20 %, 공기로 건조한 산업용 석영사 69 %로 구성된다. 시험시작 1 주일 전, 인공토양을 혼합하여 실온에서 2 일간 보관해 산도평형을 맞춘다. pH와 최대 보수력을 결정하기 위해 시험시작 1 일 ~ 2 일 전 탈이온수로 수분을 공급하여 최대 보수력의 40 % ~ 60 %의 수분함유량을 얻는다. pH는 토양에 1 mol/L의 염화칼륨을 1 : 5로 혼합하여 측정한다. pH 6.0 \pm pH 0.5 범위 유지를 위해 탄산칼슘을 사용한다.

시험시작과 종료 시, 인공토양 표본을 105 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하루 동안 (12 시간 이상) 건조하고, 그 무게를 측정하여 수분함유량을 측정한다. 대조토양이 시험토양보다 영양이 풍부하면 성장저해는 용량-반응곡선에서 더욱 분명해지는 것에 유의하여 위양성(False positive)을 피하도록 한다.

1.3 표준물질(Reference substance)

시험환경의 균일성과 시험식물의 민감도를 입증하기 위해 대조토양 (양성 대조군)에 표준물질을 추가한다. 표준물질로 황산아연, 붕산, 트리클로로아세트산 나트륨이 추천된다. 적합한 표준물질의 선정은 추후 시험 및 검증과정에서 수행된다.

1.4 장치 및 기구

1.4.1 식물생장 조절실(Phytotron)

식물생장실, 온실 또는 특정 조건을 유지하기에 적합하여야 한다.

1.4.2 저울

정확도 \pm 0.1 mg로 무게를 측정할 수 있는 것과, 10 kg 가량의 더 큰 하중을 수용할 수 있는 저울을 사용한다.

1.4.3 체(Sieve)

망의 크기가 4 mm ~ 5 mm 인 것을 사용한다.

1.4.4 시험용기(Test vessels)

400 g의 질량과 73.5 mm²의 표면적의 토양을 담기에 적절한 플라스틱 용기로, 지름 10 mm \pm 2 mm의 섬유유리 심지가 장치되어있는 것을 사용한다.

1.5 종자의 준비

동일하게 가공하지 않은 10 개의 종자를 준비 한다. 구멍을 만들어 종자 1 개를 각 구멍에 넣고 토양을 덮거나, 핀셋으로 종자를 집어 원하는 깊이에 바로 심는다. 구멍의 깊이는 각각 순무는 5 mm ~ 10 mm, 귀리는 10 mm ~ 15 mm로 하여 구멍마다 종자 하나씩을 넣고 토양표면을 고르게 만든다. 귀리종자는 중량단위로 선택하는데 너무 가볍거나 무거운 종자는 제외한다. 순무종자는 중량 기준으로 선택할 수 없으므로, 모양이 고르지 못한 종자를 제외한다. 기타 식물종을 선택 시, 종자 선택에 대한 별도의 기준을 제시해야 한다.

2. 시험 방법

2.1 원리

2 종의 육상식물의 발아, 초기생장 및 생식을 측정한다. 시험은 시험토 양과 대조토양의 일련의 회석물의 반응을 비교한다. 다양한 농도의 시험 물질을 표준대조토양에 적용해 화학물질을 시험하는데 사용한다.

각 처리마다 보통 4 회 이상 반복하는데 시험식물을 포함한 4 개의 시험 용기를 이용하게 된다. 식물의 종자를 용기당 10 개씩 토양혼합물을 포함한 용기와 기준토양이나 표준토양을 포함한 대조용기에 심는다. 용기는 온 도와 빛이 조절되는 곳에서 심지를 통해 물을 준다.

식물의 발아 후, 발아율을 결정하고, 정해진 수로 숙아준다. 2 주 후, 일부 식물들

은 생물량 측정을 위해 수확하고, 마지막에 남은 식물을 생식능력 측정을 위해 수확한다. 마지막 수확은 보통 시험 시작 후 순무는 3 주 ~ 4 주, 귀리는 5 주 ~ 6 주에 실시한다.

식물은 용기당 8 개로 숙고 14 일째와 시험 마지막에 각 4 개씩 수확한다. 8 개 이하의 식물이 발아한다면 14 일에 4 개를 남긴 채 수확하고 마지막 재배 시 4 개를 수확한다.

식물에 대한 토양의 적합성 평가를 위해 회석하지 않는 시험토양에서 상대적인 억제율을 측정한다. 일련의 회석물을 기초로 얻은 용량-반응 곡선으로부터 NOEC, LOEC, EC_x 값을 계산한다.

2.2 시험

2.2.1 예비시험

시험용기에 심지를 통해 급수 적용가능성을 평가한다. 두 개의 시험용기에 각각 시험토양과 대조토양을 채질하여 담고, 수분공급용기위에 설치한다. 24 시간 후 물이 심지를 통해 토양의 표면에 닿으면 심지를 통한 급수가 가능하도록 한다.

2.2.2 사전시험(범위설정)

토양에 적용하는 화학물질의 독성 시험 시 의무적으로 실시하고, 식물생장에 영향을 미치는 혼합비의 범위 결정 시에는 선택적으로 실시할 수 있다.

2.2.3 최종시험

토양 혼합물이나 시험물질의 농도는 예비시험에 기초하여 최소 5 가지를 준비한다. 각 처리농도 당 최소 4 개 반복구가 준비되어야한다.

3. 시험실시

3.1 시험환경

온도, 습도 및 광 조건은 시험식물의 정상생장에 적합해야 한다. 시험은 식물생장 조절실(Phytotron)이나 온실에서 진행한다. 추가로 햇빛, 발광튜브, 기체 방출기, 금속할로젠, 고압수은 및 고압 나트륨 램프를 사용 할 수 있다. 귀리와 순무의 경우 16 시간(명): 8 시간 (암)으로 하고, 광도는 13,000 렉스 \pm 2,000 렉스(lx)로 한다. 두 식물중에 대해 온도는 23 °C \pm 3 °C가 적합하고, 그 외 종 역시 정상적인 발아와 생장이 일어나는 범위의 온도를 선택한다. 오염된 토양의 시험 시, 휘발성 독성물질에 의한 건강상 위해와 교차오염을 막기 위해서는 환기가 필요하다.

실내 온도 및 습도는 1 시간 이내의 짧은 주기로 연속적으로 측정, 기록하도록 한다.

3.2 식물의 개체 수 및 솟아내기

미발아 종자 수를 고려하여 필요한 식물의 수인 8 개보다 많은 수인 10 개를 보통 심는다. 식물의 발아 직후, 용기 당 식물은 무작위로 선택하여 8 개로 줄이고, 골고루 분포시킨다. 8 개는 순무와 귀리에 대해 적용하는 것이고, 용기는 같은 방식으로, 다른 종이나 다른 크기의 용기가 사용 된 경우에는 조정 될 수 있다. 식물을 제거 할 때는 당겨서 뽑 수 있고, 토양이 너무 엉겨 있거나 식물끼리 가까이 붙어서 자란다면 자른다. 귀리를 자르면 가끔 2 차 어린 싹이 자라는데 나중에 이것도 다시 잘라준다.

3.3 수분공급

필요시마다 저수기에 탈이온수를 채워 토양 내 수분을 유지한다. 육안이나 토양의 표면을 만져서 젖었는지 확인하고 용기의 무게를 달아 필요한 수분을 보충할 수 있다. 심지를 이용한 급수 실패 시, 정기적으로 토양표면에 물을 붓거나 뿌려준다. 심지를 사용하지 않는 경우, 토양이 젖을 때까지 수동적인 방법으로 수분을 공급한다.

3.4 시험용기의 재배치

온도, 습도, 광 및 환기의 영향을 고르게 하기 위해 최소 주 2 회 정기적으로 용기들을 재배치한다.

3.5 수분작용(Pollination)

이형 순무(*Brassica rapa*)의 급속 생장형 품종인 CrGC, Syn. Rbr 경우 종자와 종실협(Seed pod)을 생산하기 위해, 개화가 시작 되면 (약 2 주 후) 인위적으로 수분작용이 일어나도록 한다. 면봉이나 파이프 청소기구, 부드러운 붓, 벌침 등을 사용하여 개화가 성공적으로 일어나면, 일주일에 2 번 이 과정을 반복한다.

4. 관찰

4.1 유식물의 발아

발아 한 유식물의 수를 용기별로 세고 평균 발아량을 백분율로 표현한다. 시기는 대조용기 내 유식물의 50 %가 발아했을 때로 한다.

4.2 14 일째의 수확

대조용기 내 유식물의 50 %가 발아하고 14 일째, 용기 당 4 개의 식물을 남기고 무작위로 토양의 표면에서 자른 후, 다음 종말점을 측정한다.

- (1) 식물 당 눈에 보이는 꽃봉오리의 존재/부재 확인(순무만 해당);
- (2) 식물 당 꽃의 개수(순무만 해당);
- (3) 식물 당 생중량(식물 절단 직 후 측정);
- (4) 생존 식물의 비율(숙은 후 수와 비교 한 식물의 백분율);
- (5) 손상된 식물의 수(노랗게 되거나 시드는 등 식물의 질적인 수)

4.3 최종수확

남아있는 식물체의 정확한 수확날짜는 사전에 정하기 어렵다. 귀리는 대

조처리에서 개화 후 수확하고 보통 7 주에서 8 주 후이다. 순무는 대조처리에서 종신허이 발아할 때 수확하고 보통 5 주에서 6 주 후이다.

식물은 토양표면에서 절단하고, 다음 종말점을 측정한다.

- (1) BBCH(Biologische Bundesanstalt Bundessortenamt und Chemische Industrie) 분류체계에 따른 성장 단계(Growth stadium)(주 1);
- (2) 식물당 개화한 총 수(귀리만 해당);
- (3) 생식력 있는 종자를 가지는 종신허의 수(눈에 띄게 부른 것)-(순무만 해당);
- (4) 식물 절단 직 후 어린 싹의 생중량 (귀리: 개화 없이, 순무:종신허 없이);
- (5) 식물 절단 직 후 개화한 꽃(귀리) 또는 종신허(순무)의 생중량;
- (6) 어린 싹의 수분 함유량, 용기 당 개화 및 종신허, BBCH 성장단계와 명백한 차이가 대조식물과 시험식물 사이에서 발견 되는지 여부;
- (7) 어린 싹의 건조중량
- (8) 개화한 꽃(귀리) 또는 종신허(순무)의 건조중량;
- (9) 죽은 식물의 비율(숙은 후 숫자와 비교 시 식물의 백분율);

4.4 시험일정표

기간 ^a	활동 (정의 된 시험)
예비시험 활동 1 단계	시험토양 준비 (공기-건조, 체질, 토양특성 결정) 토양이 심지를 통해 급수 시 확인하기 위한 예비시험 시험용기 준비(라벨링, 심지 설치)
예비시험 활동 2 단계	시험토양 혼합물 준비 및 시험 항목 적용 -화학물질 시험 -저장액 또는 유상액(에멀전) 준비 및 토양으로 혼합 또는 석영사 코팅 -유기용매를 증발시킨 후 코팅 된 규사를 토양에 혼합 -토양 시험: 시험토양을 대조토양과 혼합 -시험토양이나 토양 혼합물로 시험용기를 채움 -종자의 파종 -시험용기를 시험장소에 배치함(무작위 기법) -초기 토양 수분공급
예비시험 활동 3 단계	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 수분공급 발아한 유식물의 수를 세고, 숙아내기 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회)
1 일째	대조 용기 내 50 % 발아
14 일째	시험 식물의 1차 수확 수확 된 식물의 육안 검사 및 생물량 측정
15 일 ~ 35 일째	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 수분공급 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회) 성장주기가 빠른 순무의 꽃의 수분활동(주 2 회)
35 일째 ^b	성장주기가 빠른 순무의 최종 수확 수확 된 어린 싹과 종실험의 육안적 관찰 및 생물량 측정
35 일 ~ 49 일째	필요시 위와 동일하게 저수기를 물을 채우거나 시험용기에 급수 시험장소에서 시험용기 재배치(주 2 회)
49 일째 ^b	귀리의 최종 수확 수확된 어린 싹과 개화한 꽃의 육안 검사 및 생물량 측정
<p>a : 주어진 일정표는 귀리 및 성장주기가 빠른 순무를 이용한 시험에 적용하기 위한 것이다. 만약 다른 종을 시험한다면 다른 생장 기간에 수확될 것이다.</p> <p>b : 제시 된 자료들은 시험조건에 따라 번식 종말점(순무의 종실험 또는 귀리의 개화)까지의 기간은 달라질 수 있다.</p>	

5. 유효성 기준

유효성을 확인하기 위해서는 다음기준이 만족되어야 한다.

- (1) 대조식물의 발아율이 최소 75 %이다 (모든 반복시험구의 평균값).
- (2) 건강한 식물의 발달 : 식물은 누렇게 되지 않고, 꽃은 첫 3 주(순무) 또는 8 주(귀리)에 나타난다.
- (3) 시험 도중 용기 당 발아한 식물 중 1 개 이상은 죽지 않는다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

측정 된 결과는 표로 나타낸다.

표는 다음 정보들을 포함하여야 한다.

- 1.1 용기 당 종자의 수
- 1.2 용기 당 발아한 유식물의 수
- 1.3 14 일 째 용기 당 생존한 식물의 수
- 1.4 14 일 째 절단 후, 용기 당 남아있는 식물의 수
- 1.5 14 일 째 수확된 식물의 어린 싹 길이
- 1.6 14 일 째 꽃봉오리의 발아 (순무)
- 1.7 14 일 째 꽃의 수 (순무)
- 1.8 14 일 째 각 수확된 식물의 생중량
- 1.9 용기 당 시험 마지막에 생존한 식물의 수
- 1.10 시험 마지막에 수확된 식물의 어린 싹 길이
- 1.11 시험 마지막에 식물 당 꽃의 수 (귀리)
- 1.12 시험 마지막에 식물 당 종실험의 수 (순무)
- 1.13 식물 당 어린 싹의 생중량 (귀리 : 꽃 제외, 순무: 종실험 제외)
- 1.14 식물 당 개화한 꽃의 생중량 (귀리)
- 1.15 종실험의 생중량 (순무)
- 1.16 각 처리에 대한 어린 싹, 개화, 종실험의 수분 함유량

1.17 어린 싹, 개화, 종신허의 계산된 건조중량 (수분함유량이 처리군 사이에 차이가 큰 경우)

평균값은 그래프로 나타내고, 시험물질의 농도 및 토양 혼합물의 비율과 비교한 값의 표준편차를 포함한다. 그래프에서 표현된 곡선은 시험물질로 야기되는 영향의 규모 및 발생양상을 보여준다. 농도나 혼합비는 토양의 건조중량에 기초하여 나타낸다.

2. 통계적 분석

2.1 사전시험

명확한 용량-반응관계가 보이는 경우, EC_x 값은 로지스틱 회귀함수나 프로빗분석과 같은 회귀 분석법을 이용하여 산출한다. 그렇지 않은 경우 EC_x 범위는 전문지식에 의해 결정되어야 한다.

2.2 최종시험

시험자료는 2 가지 방식으로 분석된다. NOEC의 접근법에서 동변량성(변이의 균질성)의 통계적 분석은 코크란검증법을 통해 만들어 진다. 균질성에 대한 필요조건을 만족하지 못하면, 시험자료의 변화로 문제를 해결할 수 있는지 평가한다. 그렇지 않으면 비모수적 방법을 사용한다. 한계시험이 수행되고, 모수적 시험절차의 전제조건이 만족되면 Student t-test 나 Mann-Whitney U-test를 이용한다. EC_x접근법은 명확한 용량-반응 관계가 성립되었을 때만 사용한다. 가능하면 R²은 0.7이상으로 하고, 사용하는 시험 농도는 20 % ~ 80 % 범위를 포함하도록 한다.

필요조건을 만족하지 못하면 시험결과의 해석을 위한 별도의 전문 지식이 필요하다. EC_x 값을 산출하기 위해서, 적절한 용량-반응 함수를 만든 후(예 : 프로빗함수 또는 로지스틱함수), 회귀분석에 사용할 처리에 대한 평균값이 필요하다. 대조 평균값의 x %에 부합하는 값을 회귀분석법으로 만든 방정식에 대입하면, 원하는 EC_x 값이 얻어진다. EC₅₀ 값과 비교했을 때 더 작은 효과농도(예:

EC₂₀)는 신뢰한계가 더 작으므로, EC₅₀ 값을 사용할 것을 권장한다. EC₅₀보다 작은 효과농도를 사용하였을 경우에는 이유를 제시한다. 어떤 경우에도, 통계적 평가의 결과들은 생물학적으로 해석되어야 한다. 제시된 통계적 방법들은 호메시스 효과의 경우 적합하지 않다.

3. 결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

- 3.1 국제표준에 대한 참고문헌. (ISO 22030:2005)
- 3.2 실험설계 및 과정에 대한 전체적인 설명
- 3.3 시험식물의 종 (품종, 출처)
- 3.4 시험토양
- 3.5 대조토양 (종류, 출처)
- 3.6 용기의 크기 및 재료
- 3.7 토양의 전처리, 혼합 및 시험물질의 첨가 방법들 (해당 시)
- 3.8 용기 당 토양의 중량
- 3.9 배양 조건 및 다음을 포함
 - (1) 환경의 형태 (식물생장 조절실, 실험실, 온실 등)
 - (2) 온도
 - (3) 습도
 - (4) 광조건
- 3.10 파종 깊이
- 3.11 수분공급방법
- 3.12 수분작용, 수확 등을 포함한 시험조작에 대한 세부사항
- 3.13 사용된 통계적 방법을 포함한 종말점
- 3.14 육안으로 관찰되는 손상의 정량적인 설명
- 3.15 결과에 대한 고찰

- 주 1) Lancashire, P.D., Bleiholder, H., Boom, T.V.D., Langelüddeke, P., Strauss, R., and Witzemberger, E.W.A.(1991) A uniform decimal code for growth stages of crops and weeds. Ann. Appl. Biol., 119, pp. 561~601

제8항 활성슬러지 호흡저해 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 호기성 미생물을 이용한 하수 또는 폐수처리장 기능을 억제할 수 있는 물질들을 신속하게 검색하고 미생물분해시험에서 미생물 활성을 저해하지 않는 시험물질의 적절한 농도를 설정하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 호흡률(Respiration rate)

호기성 슬러지 혹은 폐수 미생물의 산소 소비량을 의미하며 시간당 mg O₂/L로 표시

2.2 50 % 영향농도(EC₅₀)

본 시험에서 시험물질을 처리하였을 때 대조군 호흡률의 50 % 수준을 나타내는 시험물질의 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 수용해도, 증기압, 구조식 및 순도 등은 시험에 유용한 정보로 사용될 수 있다.

1.2. 장치 및 기구

1.2.1 측정장치(<그림>)

1.2.2 공기공급장치

1.2.3 pH 전극 및 pH 측정기

1.2.4 O₂ 전극

1.2.5 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3 시험물질 용액

시험용액은 시험시작 시에 시험물질 농축용액(Stock solution)을 조제한 후 희석하여 사용한다. 시험원액의 농도는 1.4.항의 절차를 따르는 경우 0.5 g/L가 적절하다.

1.4 대조물질 용액

3,5-dichlorophenol 0.5 g을 1N NaOH 10 mL에 용해시키고 증류수를 이용하여 약 30 mL로 희석시킨 후, 침전이 생기기 시작할 때까지 1N H₂SO₄ (약 8 mL)을 첨가하고, 마지막으로 이 혼합액에 증류수를 넣어 1 L로 희석한다. 이 용액의 pH 범위는 7 ~ 8이어야 한다.

1.5 합성 오수 조제

물 1 L에 다음 양의 물질을 용해시켜 합성 오수를 만든다. (주 1, 주 2)

1.5.1 Peptone 16 g

1.5.2 고기 추출물 (Meat extract) 11 g

1.5.3 요소 (Urea) 3 g

1.5.4 NaCl 0.7 g

1.5.5 CaCl₂ · 2H₂O 0.4 g

1.5.6 MgSO₄ · 7H₂O 0.2 g

1.5.7 K₂HPO₄ 2.8 g

1.6 미생물 접종물

1.6.1 일반적으로 하수처리장에서 얻은 활성 슬러지를 시험용 미생물 접종물로 사용한다. 가급적 생활하수 처리장에서 얻은 활성 슬러지를 사용해야 하나 이것이 불가능한 경우, 산업폐수 처리장의 슬러지 중 적응 후 미생물활성이 회복된 슬러지를 사용할 수 있다. 그러나 산업폐수 처리장의 활성 슬러지를 이용한 시험 결과는 불규칙할 수 있다.

1.6.2 활성 슬러지를 실험실로 가지고 온 후, 필요한 경우에 슬러지를 수돗물이나 등장액으로 세척한다. 원심분리한 후 상등액을 따라 버리는 과정을 3 회 반복 수행한다. 세척한 슬러지를 조금 덜어 무게를 달고 건조시킨다. 이 결과로부터 $4 \text{ g/L} (\pm 10 \%)$ 수준의 부유물 상태의 슬러지를 얻기 위해 물에 현탁되어야 하는 젖은 상태의 슬러지 양을 계산할 수 있다. 아래 항의 절차를 따르는 경우, 시험 매체 내에서 슬러지의 농도는 1.6 g/L 가 된다.

1.6.3 슬러지를 채취한 날 슬러지를 사용할 수 없는 경우, 위 항에 따라 만든 각 활성 슬러지 1 L에 합성 오수 50 mL를 첨가하고 $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ 조건에서 하룻밤 동안 공기를 공급하여 준다. 공기는 사용하기 전까지 낮에도 공급하여 준다. 사용 전 pH를 확인하고 필요한 경우 중탄산나트륨 용액을 이용하여 pH를 6.0 ~ 8.0로 조절한다.

1.6.4 며칠 동안(최대 4일) 계속 사용하기 위해 동일 배치(Batch)의 슬러지가 필요한 경우, 하루 일정이 끝나기 전에 합성 오수 50 mL를 추가로 첨가한다.

2. 시험방법

2.1 원리

표준량의 합성 오수를 첨가한 활성 슬러지의 호흡률을 접촉 30 분 후 및/또는 3 시간 후에 측정한다. 다른 조건은 동일하게 한 조건에서 여러 농도의 시험물질이 있는 상태에서 동일한 활성 슬러지의 호흡률을 측정한다. 특정 농도에서 시험물질의 억제 효과를 두 대조군의 평균 호흡률로 표시한다. 서로 다른 농도에서의 측정값들로부터 EC_{50} 값을 계산한다.

2.2 시험절차

2.2.1 본시험에는 적어도 5 개 이상의 농도를 대등수 간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 농도결정시험을 통해 본시험의 시험물질에 대한 농도를 결정할 수 있다.

2.2.2 시험물질이 없는 대조군을 시험의 처음과 끝에 각각 두어 시험한다. 각 배치의 활성 슬러지도 대조물질을 이용하여 점검해야 한다.

2.2.3 대조물질은 알려져 있는 호흡 억제물질인 3,5-dichlorophenol을 사용하여 슬러지의 민감도가 정상적이라는 것을 확인하는 방법으로 각 배치의 활성 슬러지에 대해 EC_{50} 을 측정하는 것이 바람직하다.

2.2.4 3 시간의 접촉 시간 동안 시험물질과 대조물질에 대한 실험 절차는 아래와 같다.

- (1) 몇 개의 용기(예, 1 L 비이커)를 사용한다.
- (2) 시간 “0”에서 물을 첨가하여 합성 오수 16 mL를 300 mL로 만든다. 200 mL의 미생물 접종물을 첨가한 후 이 혼합액(500 mL)을 첫 번째 용기(첫 번째 대조군 C_1)에 붓는다. 파스퇴르 피펫을 이용하여 분당 0.5 L ~ 1 L의 공기가 공급되도록 한다.
- (3) 시간 “15 분”(15 분은 임의적으로 정한 간격이지만, 편의상 15 분을 사용한다.)에서 시험물질 농축용액(Stock solution) 100 mL를 합성 오수 16 mL에 첨가하고 물을 넣어 300 mL로 만든 후 미생물 접종물을 넣어 500 mL가 되도록 한다. 이 혼합액을 두 번째 용기에 붓고 (2)에서처럼 공기를 공급한다. 부피가 다른 시험물질 원액을 이용하여 15 분 간격으로 이 과정을 반복하면 서로 다른 농도의 시험물질이 들어있는 일련의 시험용기들이 생기게 되며, 마지막으로 두 번째 대조군(C_2)을 만든다.
- (4) 3 시간 후에 첫 번째 시험용기에 들어있는 내용물을 측정 장치에 붓고 10 분 동안 호흡률을 측정한다. 호흡률 측정은 시험용기 내에서 직접 측정할 수도 있다.
- (5) 각 시험용기에 대해 (4)와 같이 15 분 간격으로 호흡률을 측정한다.
- (6) 위와 같이 동일한 방법으로 각 배치의 미생물 접종물에 대해 대조물질을 이용하여 시험한다.
- (7) 접촉 시간 30 분 후 호흡률을 측정하는 경우, 하나 이상의 산소 측정기를 사용하는 등의 다른 시험체계를 갖추어야 한다. 화학적 산소 소비량(COD)값이 필요한 경우, 활성 슬러지를 제외한 시험물질, 합성 오수 및 물이 포함된 시험용기를 추가적으로 두어야 한다.

- (8) 30 분 및/또는 3 시간의 접촉기간 동안 공기를 공급한 후, 산소 소비량을 측정하고 기록한다.

2.3 시험환경 및 시험상 유의사항

2.3.1 본 시험은 수용성이며 휘발성이 낮은 대부분의 물질에 대해 적용될 수 있으나, 시험 용매에 제한적 용해도를 갖는 시험물질에 대해서는 EC_{50} 값을 산출하지 못할 수도 있다.

2.3.2 시험수행에 적절한 조건은 아래와 같다

- (1) 기간/접촉 시간 : 30 분 및/또는 3 시간, 이 기간 동안 공기를 공급하여 준다.
- (2) 용기 : 비이커가 적절하다.
- (3) 물 : 식용수 (필요한 경우 염소 제거)
- (4) 공기 공급 : 깨끗하고 유분이 없는 공기로 분당 0.5 L ~ 1 L의 유속이 적절하다. 시험용기는 지속적으로 산소가 공급되어야 하며 용존 산소농도가 2.5 mg/L 이하가 되지 않도록 한다. 또한 호흡률 측정 직전에 산소 농도는 약 6.5 mg/L이어야 한다.
- (5) 측정 장치 : BOD 플라스크 같은 바닥이 평평한 플라스크 (그림 1)
- (6) 산소 측정기 : 전위차 기록장치 (200 mV 범위)에 연결할 수 있는 Polarograph 방식의 산소 전극
- (7) 영양분 용액 : 합성 오수
- (8) 시험물질 : 시험용액은 시험 시작시에 조제한다.
- (9) 대조물질 : 예 : 3,5-dichlorophenol (적어도 3 개 농도)
- (10) 대조군 : 시험물질이 없는 접종 샘플
- (11) 온도 : $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.3.3 두 대조군의 호흡률은 각각 15 % 이내이어야 하며, 3,5- dichlorophenol의 3 시간 EC_{50} 범위가 5 mg/L ~ 30 mg/L에 들어야 한다.

2.3.4 활성 슬러지가 병원균을 가지고 있을 수 있으므로 주의해서 취급하여야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 호흡률은 약 6.5 mg O₂/L와 2.5 mg O₂/L 사이의 값으로 기록 장치로부터 시간 단위로 계산되나, 호흡률이 낮은 경우에는 10 분 동안의 기록을 이용하여 계산한다. 호흡률이 측정되는 동안의 호흡률 그래프 부분은 직선이어야 한다.

1.2 특정 농도에서 시험물질의 억제 효과를 계산하기 위해서 호흡률은 두 대조군 호흡률의 평균 %로 표시된다.

$$\{1 - [2R_s / (R_{d1} + R_{d2})]\} \cdot 100 = \% \text{ 억제}$$

R_s = 시험물질 농도에서 산소 소비량

R_{d1} = 대조군 1의 산소 소비량

R_{d2} = 대조군 2의 산소 소비량

1.3 두 대조군의 호흡량 차이가 서로 15 % 이내에 들지 않거나, 대조물질의 3시간 EC₅₀이 허용범위 (3,5-dichlorophenol에 대해 5 mg/L ~ 30 mg/L)에 들지 않는 경우, 해당 시험은 부적절한 것으로 판단하여 재시험해야 한다.

1.4 각 시험농도에서, % 억제를 계산한다. % 억제는 log-normal (혹은 Log-probability) 용지에 각 농도에 대해 그래프를 그려서 EC₅₀ 값을 구할 수 있다.

1.5 표준 절차를 사용하여 95 % 신뢰한계에서의 EC₅₀ 값을 결정할 수 있다. 결과는 1 이하, 1 ~ 10, 10 ~ 100 (단위 : mg/L) 등 크기의 순으로 놓는 게 바람직하다.

2. 결과의 해석

환경에서 일어나는 복잡한 상호작용을 실험실에서 정확히 반영할 수 없기 때문에, EC₅₀ 값은 활성슬러지 처리 또는 폐수 미생물에 대해 예상되는 시험물질의 독성에 대한 추정할 수 있는 참고자료로 이용한다.

3. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

3.4 시험계 : 활성 슬러지의 출처, 농도, 전처리.

3.5 시험조건

(1) 시험 온도

(2) 시험 기간

(3) 대조물질과 대조물질의 EC_{50} 값

(4) 비생물적 산소 소모 (있는 경우)

3.6 시험결과

(1) 모든 측정 자료

(2) 억제 그래프 및 EC_{50} 계산 방법

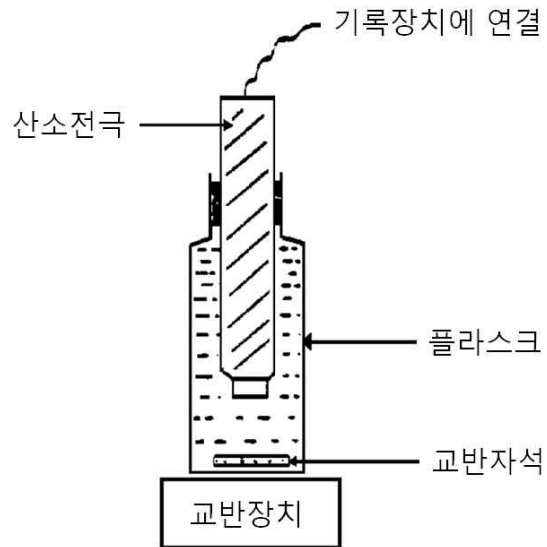
(3) EC_{50} 값, 가능하다면 95 % 신뢰 한계에서의 EC_{20} 값 및 EC_{80} 값

(4) 결과에 영향을 줄 수 있는 모든 관찰사항과 시험방법으로부터의 이탈 사항

주 1) 이 합성 하수 조제물의 농도는, OECD 기술 보고서인 “합성 세제용 계면활성제의 미생물분해도 결정을 위해 제시된 방법(1976.6.11)”에 기술된 농도보다 100 배가 높다. 여기에서는 K_2HPO_4 가 첨가되어 있다.

주 2) 합성 하수 조제물을 바로 사용하지 않는 경우, 성분의 변화가 없는 한 일주일 정도 $0\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 암조건에서 보관할 수 있다. 조제물은 보관 이전에 멸균하거나 Peptone과 고기 추출물을 시험 직전에 첨가하여 사용할 수 있다. 사용 전에 완전히 혼합하고 pH를 조정한다.

별 침



※ 상부의 공간이 없어야 하며, 탐침은 측정 플라스크의 목에 틈이 없도록 고정되어야 한다.

<그림> 측정장치도

제9항 어류 초기생장단계독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험방법은 화학물질에 대한 수서생물의 생장단계에 따른 독성영향을 평가하기 위해 어류의 생장 초기단계에 미치는 화학물질의 영향을 측정하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3 유수식 시험(Flow-through test)

시험 기간 중 시험용액을 연속적으로 흘려주면서 새로 교환하는 시험

2.4 반지수식 시험(Semistatic test)

시험 기간 중 일정기간마다 시험용액을 새로 교환하는 시험

2.5 단위

농도는 중량/용량(mg/L)로 표시

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 어류 급성독성값은 생육초기독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 급성독성값이 본 시험에서와 동일 어종인 경우는 시험물질의 농도 설정에 도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 안정성, pK_a , P_{ow} 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

1.2.2 온도제어 장치 : 시험에서의 설정 온도 범위에서 온도 편차를 $\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이내로 유지 한다.

1.2.3 pH 측정기

1.2.4 용존산소 측정기

1.2.5 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3 희석수

1.3.1 양질의 천연수나 탈염소 처리한 수도수를 사용할 수 있다.

1.3.2 희석수의 수질은 다음의 기준을 넘지 않은 것을 사용한다.

총 유기탄소(Total organic carbon) 2 mg/L 이하, 비이온성 암모니아(Unionized ammonia) $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 이하, 잔류염소 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ 이하

1.4 시험 어류

독성시험에 사용하는 어류는 담수 및 염수에 서식하는 어종 중에서 쉽게 구할 수 있고 경제적, 생태적 요인을 고려하여 결정한다. 시험어종은 다음에 추천된 종중에서 선택한다.

1.4.1 사용어종 및 시험(사육)온도

- (1) 송사리(*Oryzias latipes*, ricefish) : 담수, 24 °C ± 1 °C (수정란), 23 °C ± 1 °C (부화 후)
- (2) 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*, rainbow trout) : 담수, 10 °C ± 2 °C (수정란), 12 °C ± 2 °C (부화 후)
- (3) 북미산 잉어(*Pimephales promelas*, fathead minnow) : 담수, 25 °C ± 2 °C
- (4) 제브라피쉬(*Danio rerio*, zebra fish) : 담수, 25 °C ± 2 °C
- (5) 미노우(*Cyprinodon variegatus*, sheepshead minnow) : 염수, 25 °C ± 2 °C
- (6) 잉어(*Cyprinus carpio*, common carp) : 담수, 21 °C ~ 25 °C
- (7) 연어류(*Oncorhynchus kisutch*, coho salmon) : 담수, 10 °C (수정란), 12 °C (부화 후)
- (8) 연어류(*Oncorhynchus tshawytscha*, chinook salmon) :
담수, 10 °C (수정란), 12 °C (부화 후)
- (9) 연어류(*Salmo salar*, atlantic salmon) : 담수, 10 °C
- (10) 송어류(*Salmo trutta*, brown trout) : 담수 10 °C
- (11) 송어류(*Salvelinus fontinalis*, brook trout) : 담수, 10 °C
- (12) 송어류(*Salvelinus namaycush*, lake trout) : 담수, 12 °C ~ 18 °C
- (13) 블루길(*Lepomis macrochirus*, bluegill) : 담수, 21 °C ~ 25 °C
- (14) 얼룩메기(*Ictalurus punctatus*, channel catfish) : 담수, 26 °C
- (15) 대서양 실버사이드(*Menidia menidia*, atlantic silverside) : 염수 22 °C ~ 25 °C
- (16) 조수 실버사이드(*Menidia peninsulae*, tidewater silverside) : 염수 22 °C ~ 25 °C

1.4.2 수정란 채취

시험어류로부터 채란한 수정란은 비이커나 유리 페트리디쉬에 옮기고, 미수정란을 제거한 후 수조로 옮겨 시험에 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

어류의 초기단계(수정란 단계)에서 일정농도의 시험물질에 노출시킨 후, 일정시간 동안의 치사영향, 발생장애, 기형 등을 관찰하고 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 최소영향관찰농도, 무영향관찰농도 등을 평가한다.

2.2 시험

2.2.1 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등 간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 필요한 경우 예비시험 단계를 거쳐 농도범위를 보다 좁게 설정하여 시험할 수 있다. 농도범위는 급성독성시험 등의 자료를 토대로 처리군의 최고 농도가 LC_{50} 값을 넘지 않도록 한다.

2.2.2 만일 시험물질 조제 시 유기용매나 분산제를 사용하는 경우는 원래의 대조군 외에 이들 물질이 포함된 유기용매 대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 하며 유기용매 농도는 0.1 mL/L 이하가 되도록 한다.

2.2.3 한 농도 당 처리한 수정란의 수는 통계적으로 유의성을 나타낼 수 있도록 충분해야 하며, 처리군 당 수정란의 수는 동일하게 한다. 처리군 당 수정란의 수는 최소한 60 개 이상으로 하며, 동일 농도에서 2 개 이상의 반복수를 두도록 한다.

2.2.4 시험의 방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 갈아주는 반지수식 방법을 사용한다.

2.2.5 시험의 시작은 수정된 직 후부터 실시한다. 수정란의 배반구가 분할되기 직전 또는 바로 직후의 것들을 시험용액에 노출시킨다.

2.2.6 독성시험 기간은 수정란이 부화하고 대조군의 치어가 먹이를 공급하지 않아도 생존할 수 있는 정도의 기간을 최소 기간으로 한다. 따라서 시험기간은 시험어종에 따라 다를 수 있다. 노출 기간을 연장할 경우 먹이를 공급한다.

2.2.7 시험기간 동안 용존산소와 수온은 매일 측정하며, 경도와 pH는 시험시작과 종료 시 측정한다. 수온은 대조군의 한 수조에서 연속적으로 측정하는 것이 필요하다. 한편 수정란 및 부화어의 상태는 매일 관찰하고 기록하며, 만일 치사 개체가 발견되면 즉시 제거한다.

2.2.8 수정란의 경우 알의 색깔이 불투명해지거나 배아 단계에서 심장박동이 정지하였을 경우 사망한 것으로 간주한다. 부화한 개체의 경우 호흡이 정지하거나 외부 자극에 대해 전혀 반응이 없는 것을 사망개체로 판정한다.

2.3 시험환경

2.3.1 수정란의 무게와 시험수의 비율은 0.5 g/L를 넘지 않도록 한다. 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.2 시험물질을 처리한 후, 시험용액의 pH가 현저하게 변화할 시 시험목적에 따라 시험물질 용액의 pH를 염산 또는 수산화나트륨으로 조절할 수도 있다. 이때 대조군에도 동일한량을 첨가하여야 하며, pH를 조정할 때 시험물질의 농도가 변화한다거나 화학반응이 일어나서는 안된다.

2.3.3 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 으로 한다.

2.3.4 시험기간 동안 필요한 경우 먹이는 공급하되 시험어종의 발육단계에서 가장 적절한 먹이(예 : 송사리의 경우 알테미아)와 횡수로 공급한다.

2.3.5 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 한다.

2.4. 조사항목

2.4.1. 수정란 발생단계

시험 시작 시 노출시킨 수정란의 배(Embryo) 발생단계를 가능한 한 정확하게 파악하도록 한다.

2.4.2. 부화와 생존율

24 시간 마다 생존개체와 부화여부를 관찰하여 정확히 기록하도록 한다. 사망한 수정란 및 치어는 즉시 제거함으로써 다른 개체에 영향을 주지 않도록 한다. 각 단계별 사망 기준은 다음과 같다.

- 수정란 : 탁해지고, 색깔의 변화가 있는 것
- 배 : 배 안에서 심장박동과 같은 움직임이 없는 것
- 치어 : 호흡 및 심장박동이 없거나 자극에 대해 반응이 없는 것

2.4.3. 비정상적 외형

외부 형태가 기형적인 개체를 기록하며 사망한 경우에만 수조에서 제거한다.

2.4.4. 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적 행동을 보이는 개체는 기록한다.

2.4.5. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 무게를 측정하는데 개체별로 측정하는 것이 바람직하나 무게 측정이 어려운 경우는 군별(시험용기별)로 측정할 수 있다. 무게는 건 중량으로 표시한다.

2.4.6. 길이

시험이 종료되면 각각의 생존 개체에 대해 전장(머리부터 꼬리지느러미까지)을 측정하는데, 만일 꼬리지느러미의 부식 또는 손상에 따른 이상이 발생할 경우 체장(머리부터 꼬리지느러미를 제외한 몸체길이)을 측정한다.

2.5 시험상의 유의사항

2.5.1 시험기간 중 시험물질 농도는 주기적으로 측정하여야 하는데 적어도 주 1 회 의 분석치가 있어야 하고, 시험기간 동안 시험농도가 설정농도의 $\pm 20\%$ 이내로 유지되도록 한다(측정시의 수치가 설정 수치와 다를 경우 시험농도는 측정 수치를 적용한다).

2.5.2 시험 기간 중 대조군의 부화율은 최소 66 % 이상이 되도록 하고, 부화 개체의 경우 시험 종료 시까지 생존율이 가능한 한 70 %를 넘도록 한다.

2.5.3 유기용매 대조군에서의 영향이 대조군과 비교하여 유의한 차이가 있어서는 안 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4 시험종

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 먹이 종류, 공급량, 공급 빈도 등

(4) 시험어류의 무게, 길이

(5) 시험시작시의 수정란 발달단계, 수집 및 수정란 취급방법

2.5 시험조건

(1) 시험과정(노출방법, 투여수정란 수, 반복수, 시험용액의 양 등)

(2) 희석수의 수질특성

(3) 시험기간 동안의 수질측정치

(4) 시험농도 및 시험물질 조제방법

(5) 시험용액의 상태(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)

(6) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6 시험결과

(1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항

: 기형상태, 유영상태, 최초 부화시작 시기, 부화종료 시기

- (2) 대조군에서의 부화율 및 부화개체의 생존율
- (3) 각 노출 농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율
- (4) 각 노출 농도별 부화율 및 부화 후 치어의 생존율
- (5) 시험 종료 후 생존개체의 체중 및 체장
- (6) 데이터의 통계분석 처리방법
- (7) 농도-반응 자료 및 그래프
- (8) 관찰무영향농도(NOEC)와 최소영향관찰농도(LOEC)
- (9) 시험과정에서 시험결과에 영향을 줄 수 있는 요인의 발생 여부

제10항 물벼룩류 생식능시험

I. 개요

1. 목적

본 시험의 목적은 물벼룩의 생식능력에 미치는 시험물질의 영향을 파악하는데 있다. 노출 기간 동안 시험군 모체에서 태어난 자손의 개체 수를 조사함으로써 해당 물질의 생식능에 대한 영향 여부를 파악할 수 있다. 이외에도 치사율, 최초 부화시기, 기타 독성 증상들을 대조군과 비교한다.

2. 정의

2.1 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 동안 물벼룩 모체(Parent)의 사망 또는 생식능에 영향을 나타낼 수 있는 최소 농도. 즉, 최소영향관찰농도는 대조군과 비교해 통계적으로 유의한 차이를 나타내는 처리군의 농도 중 최소값

2.2 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

최소영향관찰농도 바로 아래의 농도로서 물벼룩의 생식능에 영향을 주지 않는 최대값

2.3 영향농도(EC_x)

용량반응 관계에서 시험물질을 처리한 물벼룩의 생식능이 대조군에 비해 X %의 감소를 일으킬 수 있는 시험물질의 농도(예, EC₅₀ : 반수(50 %)영향농도)

2.4 검출한계(Limit of determination)

화학적 분석을 통해 검출은 가능하나 정량되지 않는 최저농도 수준

2.5 치사(Mortality)

시험기간 동안 관찰한 물벼룩이 수영능력이 없거나 움직임이 없는 상태를 말하며 물벼룩이 들어 있는 시험용기를 가볍게 움직인 후 15 초 이내에 움직임이 없을 경우 치사로 간주

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 시험용기 : 유리제 용기

1.1.2 항온장치 : 18 °C ~ 22 °C의 온도범위에서 유지될 것

1.1.3 pH 측정기

1.1.4 용존산소 측정기

1.1.5 경도를 측정할 수 있는 장치 및 기구

1.1.6 자동점멸장치

1.1.7 총유기탄소(TOC) 또는 화학적산소요구량(COD)를 측정할 수 있는 장치 및 기구

1.1.8 조도 측정 장치

1.1.9 기타 일반 실험실 장치 및 기구

1.2 희석수 및 배양액

1.2.1 생식능 시험에 사용하는 희석수는 배양액과 동일한 것을 사용한다.

1.2.2 물벼룩 배양액은 조성을 반드시 기재해야 하며, 반드시 검증된 것을 사용한다. 일반적으로 OECD 시험지침에서 사용이 권장되고 있는 M4 또는 M7 배양액을 사용한다(주 1). 한편 배양액의 총유기탄소(TOC) 값은 2 mg/L를 넘지 않게(먹이인 조류를 첨가하기 전 상태) 하는 것을 권장한다.

1.2.3 배양액 또는 희석수의 pH는 6.0 ~ 9.0, 경도는 80 mg/L(CaCO_3 로서) 이상, 용존산소는 3.0 mg/L를 유지하도록 하며, 사용하기 전에 24 시간 정도 폭기시킨다.

1.3 시험종 및 먹이

1.3.1 물벼룩 가운데 *Daphnia magna* 종을 사용한다.

1.3.2 출처가 명확하고 건강한 개체를 사용한다.

1.3.3 생후 24시간 미만의 어린 개체를 사용한다.

1.3.4 먹이는 *Selenastrum*, *Chlorella* 등과 같은 대수기의 녹조류를 배양하여 공급한다. M4 또는 M7 이외의 배양액을 사용하는 경우, 조류 외에 효모(Yeast) 등의 보조 먹이를 공급할 수 있다.

1.4 시험용액의 조제

1.4.1 시험물질은 배양액에 용해 또는 분산시켜 사용한다.

1.4.2 시험물질이 비수용성이거나 수용해도가 낮은 경우는 농축액(stock solution) 제조 시 유기용매 또는 분산제를 사용할 수 있다. 유기용매(acetone, ethanol, methanol, triethylene glycol, dimethylformamide, DMSO) 등을 사용할 수 있으며, 분산제의 경우는 cremophor RH40, methylcellulose 0.01 % 또는 HCO-40 등을 사용할 수 있다. 용매나 분산제는 가능한 한 시험용액의 0.01 %(v/v)를 넘지 않도록 한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질에 물벼룩을 21 일 동안 노출하여 물벼룩의 생식능에 영향을 나타내는 농도(예 EC₁₀, EC₅₀ 등)를 산출하며, 아울러 생식능에 영향을 나타내지 않는 무영향관찰농도(NOEC) 또는 영향을 나타내는 농도 가운데 최소영향관찰농도(LOEC)를 구한다.

2.2 시험

2.2.1 총 시험기간은 21 일로 하며, 시험물질의 노출은 반지수식 또는 유수식 방법을 사용한다.

- 2.2.2 반지수식 시험의 경우, 대조군 또는 처리군 당 10 마리의 물벼룩을 사용하는데 시험용액이 담긴 각 수조 당 1 개체씩 투여한다(대조군 및 시험물질 농도 당 10 개의 반복구). 유수식 시험의 경우는 대조군 또는 처리군당 20 마리 ~ 40 마리를 사용하며, 4 개의 반복구를 둔다(예, 40 마리의 경우 10 마리씩 4 개의 반복구, 20 마리의 경우 5 마리씩 4 개의 반복구를 설정).
- 2.2.3 수조 내 시험용액의 양은 일반적으로 30 mL ~ 100 mL 범위를 두도록 하며, 시험용액의 화학적 분석 등을 고려하여 용액의 양을 보다 증가시킬 수 있다.
- 2.2.4 시험농도의 범위는 물벼룩 급성독성시험 결과 등 사전 독성정보를 참조하여 설정한다. 농도는 최소한 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 설정하며, 이때 공비가 3.2를 초과하지 않도록 한다.
- 2.2.5 시험용액 조제 시 용매 또는 분산제를 사용한 경우, 대조군 외에 용매 또는 분산제 대조군을 추가로 두도록 한다. 이때 첨가되는 용매 또는 분산제의 양은 시험군 중 최고 농도군에 첨가되는 용매 또는 분산제의 양과 동일하게 처리한다.
- 2.2.6 무영향관찰농도(NOEC) 또는 최소영향관찰농도(LOEC)를 도출하기 위해서는 최저농도에서의 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮지 않도록 최저농도를 설정하며, 반면 최고농도는 산란능이 대조군 보다 유의하게 낮은 수준으로 관찰될 수 있는 농도가 되도록 설정한다.
- 2.2.7 생식능에 대한 영향농도(ECx) 값을 산출하기 위해서 최고농도는 예측되는 영향농도 보다 충분히 높도록 설정한다.
- 2.2.8 반지수식 시험의 경우, 시험용액의 교환은 시험물질의 안정도(Stability)에 따라 교환주기를 달리할 수 있으나, 일주일에 최소한 3 회 이상을 교환하도록 한다. 한편 시험물질의 안정도가 낮다고 판단되는 경우, 시험용액은 매일 갈아주도록 하며, 가능한 경우 반지수식 보다는 유수식 시험을 실시하는 것이 바람직하다.
- 2.2.9 시험용액의 교환 시에는 새로 교환할 시험용액을 미리 준비한 후 유리피펫을 사용하여 갈아주려는 새로운 시험용액이 담긴 수조로 물벼룩을 조심스럽게 옮겨준다. 이때 피펫을 통해 물벼룩과 함께 옮겨지는 시험용액의 양은 최소화한다.

2.2.10 관찰은 매일 실시하는데 모체로부터 태어난 자손 개체수를 반드시 측정하고, 그 후 시험용액으로부터 제거한다. 측정되는 자손 개체수는 살아있는 것을 기준으로 하며, 부화되지 않은 알 또는 죽은 개체의 숫자도 별도로 기록해 둔다. 관찰 결과는 빠짐없이 기록한다.

2.2.11 최초로 생산된 자손 수와 출생 시기를 기록한다.

2.2.12 사망한 모체 물벼룩의 수도 매일 관찰하고 기록한다.

2.2.13 생식능 외에 필요한 경우 기타 항목들을 측정할 수 있다. 예를 들어 시험 종료 후에 모체의 체장(Anal spine을 제외한 몸통 길이)을 측정하여 기록한다. 그 밖에 포낭 속 알의 존재, 수컷 혹은 내구란(Ephippia)을 출현 여부 및 이들 숫자를 파악하여 기록한다.

2.2.14 시험물질이 불안정하다고 판단되는 경우, 시험용액내의 농도를 일정 간격을 두고 측정한다. 이때 시험기간 동안 시험물질의 농도는 초기농도의 80 % 이상을 유지하도록 한다.

2.3 시험환경

2.3.1 시험용액의 pH, 용존산소, 수온, 경도 등을 주기적으로 측정하며, 최소한 1 주일에 1 회 정도 실시한다.

2.3.2 시험기간 동안 조명은 명 : 암 = 16 시간 : 8 시간을 유지하도록 하며, 광도는 $15 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1} \sim 20 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 범위를 유지하도록 한다.

2.3.3 시험용액의 노출은 $18^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$ 온도 범위 내에서 실시하며, 온도의 변화는 2°C 이내를 유지하도록 한다(예, $18^\circ\text{C} \sim 20^\circ\text{C}$, $19^\circ\text{C} \sim 21^\circ\text{C}$, $20^\circ\text{C} \sim 22^\circ\text{C}$).

2.3.4 시험 도중에는 폭기하지 않는다.

2.3.5 먹이는 매일 공급하는 것을 원칙으로 하되, 일주일에 최소한 3회 이상 공급한다. 먹이는 대수기의 녹조류(*Selenastrum* 또는 *Chlorella*)를 충분히 공급한다.

2.4 시험상의 유의사항

2.4.1 대조군에서 물벼룩 모체의 사망율은 시험종료시까지 20 %를 초과하지 않아야 한다.

2.4.2 대조군에서 시험종료 시까지 물벼룩 각 모체에서 생산되는 자손의 평균 개체수는 60 마리 이상을 유지하여야 한다.

2.4.3 시험물질을 흡착할 가능성이 있으므로 물벼룩의 먹이를 지나치게 과량으로 공급하지 않아야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험 종료 후 적당한 통계적 방법을 사용하여, 무영향관찰농도 또는 최소영향관찰농도 및 영향농도를 95 %에서의 신뢰구간에서 구하며, 보고서에는 통계적 방법이 명시되어야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

(1) 명칭 (일반명, 상품명 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 화학물질의 특성 자료

2.4 시험종

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 사육방법 (먹이의 종류, 공급횟수 등)

2.5 시험조건

(1) 시험과정 (노출방법, 사용마리 수, 반복 수, 시험용액의 양 등)

- (2) 첨가물의 사용여부와 농도
- (3) 배양액 및 희석수의 수질특성(경도, pH, 알칼리도 등)
- (4) 시험온도
- (5) 광도, 광의 종류 및 광주기
- (6) 시험기간 동안의 수온, pH 및 용존산소농도 (가능하면 표로 만들 것)
- (7) 시험용액에서 시험물질의 농도와 측정날짜
- (8) 먹이의 종류, 공급량 및 공급 빈도

2.6 시험결과

- (1) 시험물질의 영향을 받은 물벼룩의 수와 퍼센트
- (2) 적용한 통계적 과정의 설명 및 근거
- (3) 기타 시험과정에서 관찰된 이상 현상
- (4) 유영저해와 생식능 감소에 대한 각각의 EC_x(최소 7 일에 1 회 및 시험종료시기), 95 % 신뢰구간, 통계적 과정
- (5) 각각의 농도에서 첫 번째 자손 생산이 이루어진 시간
- (6) 24 시간 마다 생산된 살아있는 자손 개체 수
- (7) 부화하지 못한 알의 수, 출생하였으나 사망한 자손 개체의 수
(매일 측정)
- (8) 시험기간 동안 사망한 모체 물벼룩의 수
- (9) 시험기간 동안 나타난 생식능에 대한 무영향관찰농도 또는 최소영향관찰농도
- (10) 농도-반응 그래프

주1) 물벼룩 배양액(M4 및 M7)의 조성

1) M4 또는 M7 배양액 조제

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 증류수*)	농축도(배)	M4 또는 M7 배양액**을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량 (mL/L, 증류수*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
1) 농축액 I	-	20	50	50
2) $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293,800	1,000	1.0	1.0
3) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246,600	2,000	0.5	0.5
4) KCl	58,000	10,000	0.1	0.1
5) NaHCO_3	64,800	1,000	1.0	1.0
6) $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	50,000	5,000	0.2	0.2
7) NaNO_3	2,740	10,000	0.1	0.1
8) KH_2PO_4	1,430	10,000	0.1	0.1
9) K_2HPO_4	1,840	10,000	0.1	0.1
10) Vitamin 농축액	-	10,000	0.1	0.1
Thiamine hydrochloride	750	10,000	3가지 vitamin을 하나의 증류수에 용해시켜 “Vitamin 농축액” 을 제 조한다.	
Cyanocobalamine (B_{12})	10	10,000		
Biotin	7.5	10,000		

* 증류수는 멸균 증류수를 사용한다.

** 각 농축액을 일정 비율로 섞은 후 M4 또는 M7 배양액을 제조한다.

2) 농축액 I 조제

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 증류수*)	농축도(배) - M4 기준 -	농축액 I을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량(mL/L, 증류수*)	
			M4 배지 경우	M7 배지 경우
H ₃ BO ₃	57,190	20,000	1.0	0.25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	20,000	1.0	0.25
LiCl	6,120	20,000	1.0	0.25
RbCl	1,420	20,000	1.0	0.25
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	20,000	1.0	0.25
NaBr	320	20,000	1.0	0.25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,230	20,000	1.0	0.25
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	20,000	1.0	0.25
ZnCl ₂	260	20,000	1.0	1.0
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	20,000	1.0	1.0
KI	65	20,000	1.0	1.0
Na ₂ SeO ₃	43.8	20,000	1.0	1.0
NH ₄ VO ₃	11.5	20,000	1.0	1.0
Fe-EDTA 용액		1,000	20.0	5.0
Na ₂ EDTA ₂ H ₂ O FeSO ₄ ·7H ₂ O	5,000 1,991	2,000 2,000	2 가지 농축액을 1 : 1의 비율로 혼합하여 멸균하여 Fe-EDTA 용 액을 제조한다	

*증류수는 멸균 증류수를 사용한다.

제11항 어류배아 및 난황단계 치어 독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 수서생물의 초기 생장단계에 대한 영향을 단기간에 평가하기 위해 어류의 수정란부터 부화 직후까지 기간 동안 화학물질의 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 배아(Embryo)

수정란이 분열하여 발생이 진행된 후부터 부화 직전까지 단계의 개체

2.2. 난황단계 치어(Sac fry)

부화가 된 후 난황이 흡수되기 전까지 단계의 어류 개체

2.3. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.4. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 단계의 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 어류 급성독성 값은 배아독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 특히 급성독성 값이 본 시험에서와 동일 어종에서 얻어진 경우는 시험물질의 농도설정에도움이 된다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 물에 대한 용해도, 증기압, 안정성, pK_a , P_{ow} 및 생분해성 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2. 장치 및 기구

1.2.1. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하는데 일반적으로 유리로 된 것을 사용한다.

1.2.2. pH 측정기

1.2.3. 용존산소 측정기

1.2.4. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3. 시험 어류

시험에 사용하는 어류는 아래의 어종 중에서 선택하는 것을 원칙으로 한다. 그 외의 어종을 시험어류로 사용할 수도 있으나, 선택사유 및 시험에 사용하는데 적절한 어종임을 증명할 수 있는 자료를 제시하도록 한다.

1.3.1. 사용어종, 시험(사육)온도 및 광주기

추천어종	시험수	시험온도 범위(℃)	광주기(hr)
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	담수	24 ± 1(수정란), 23 ± 1(부화후)	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
잉어 (<i>Cyprinus carpio</i> , common carp)	담수	21 ~ 25	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	담수	10 ± 2(수정란), 12 ± 2(부화후)	수정란, 배아시기 및 부화 후 일주일 동안은 암조건 유지
북미산 잉어 (<i>Pimephales promelas</i> , fathead minnow)	담수	25 ± 2	16(명) : 8(암)
제브라피쉬 (<i>Danio rerio</i> , zebra fish)	담수	25 ± 2	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
금붕어 (<i>Carrassius auratus</i> , goldfish)	담수	24 ± 1	12 ~ 16(명) : 12 ~ 8(암)
블루길 (<i>Lepomis macrochirus</i> , bluegill)	담수	21 ± 1	16(명) : 8(암)
조수실버사이드 (<i>Menidia peninsulae</i> , tidewater silverside)	염수(15 % ~ 22 %)	22 ~ 25	12(명) : 12(암)
청어 (<i>Clupea harengus</i> , herring)	염수(8 % ~ 15 %)	10 ± 1	12(명) : 12(암)
대구 (<i>Gadus morhua</i> , cod)	염수(5 % ~ 30 %)	5 ± 1	12(명) : 12(암)
양두모치 (<i>Cyprinodon variegatus</i> , sheepshead minnow)	염수(15 % ~ 30 %)	25 ± 2	12(명) : 12(암)

1.3.2. 수정란 채취

시험어류로부터 채취한 수정란은 비이커나 유리 페트리디쉬에 옮기고, 미수정란을 제거한 후 수조로 옮겨 시험에 사용한다.

1.4. 사육수 및 희석수

1.4.1. 사육수와 시험용액 조제에 사용하는 희석수는 동일한 것을 사용한다. 양질의 천연수나 탈염소 처리한 수도수를 사용할 수 있다.

1.4.2. pH 변화는 ± 0.5 범위 이내가 되어야 한다.

1.4.3. 중금속(예: Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), 주요 음이온 및 양이온 (예 : Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄), 살충제 (예. 유기인계 또는 유기염소계 살충제), 총유기탄소(TOC) 및 부유물질(SS)에 대한 측정을 주기적으로 실시하여 사육수의 수질이 일정하게 유지되고 있음을 확인한다.

1.4.4. 수질은 다음의 기준을 넘지 않은 것을 사용한다.

부유물질 20 mg/L 이하, 총유기탄소(Total organic carbon) 2 mg/L 이하, 비이온성 암모니아(Unionized ammonia) 1 µg/L 이하, 잔류염소 10 µg/L 이하, 총 유기인계 살충제 50 ng/L 이하, 총 유기염소계 살충제(PCB 포함) 50 ng/L 이하, 총 유기염소 25 ng/L 이하

2. 시험방법

2.1. 원리

어류의 초기단계(수정란 단계)에서 일정농도의 시험물질에 노출시킨 후, 배아(Embryo) 시기와 부화 직후의 난황단계 치어(Sac fry)에서의 치사영향, 발생장애, 기형 등을 관찰하고, 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 최소영향관찰농도(LOEC) 및 무영향관찰농도(NOEC) 등을 산출한다. 시험물질의 노출은 시험군 수정란부터 부화한 치어 개체의 난황이 완전히 흡수되기 직전 또는 대조군의 치어가 먹이 공급없이 생존 가능한 기간 동안 실시한다.

2.2. 시험

- 2.2.1. 시험에 사용되는 수정란은 수정된지 30 분 이내의 것을 사용하는 것이 가장 적합하다. 가능한 한 시험의 시작은 포배기 분할시점(Blastodisc cleavage stage) 전 또는 직후의 수정란을 사용하도록 하며, 적어도 낭배기(Gastrula stage) 직전의 수정란을 시험에 사용하도록 한다. 시험물질의 감도에 영향을 줄 있으므로 수정 후 최대 8 시간 이내의 것을 사용해야 한다.
- 2.2.2. 시험기간은 대조군 또는 처리군에서 부화한 Larvae 개체의 난황이 완전히 흡수된 것이 최초로 관찰되었을 때 종료시기를 그 직전까지로 한다. 또는 대조군의 치어가 먹이 공급 없이 생존할 수 있는 최대기간 동안 시험을 실시한다.
- 2.2.3. 시험물질의 한 농도 당 수정란 수는 통계적으로 유의성을 나타낼 수 있도록 충분해야 하며, 대조군 및 농도 당 수정란의 수는 동일하게 한다. 농도 당 수정란의 수는 최소한 30 개 이상으로 하며, 동일 농도에서 3 개 이상의 반복군을 두도록 한다.
- 2.2.4. 시험용액은 시험물질 농축용액(Stock solution)을 조제한 후, 희석수로 재차 희석하여 조제한다. 가능한 한 시험물질은 용해도 이내에서 조제하며, 용매나 분산제 등 보조제의 사용은 자제하도록 한다. 만일 시험물질 조제시 유기용매(Ethanol, Methanol, Acetone, Dimethylformamide, Triethyleneglycol) 또는 분산제(Cremophor RH40, Tween80, 0.01 % Methylcellulose, HCO-40)를 사용하는 경우는 원래의 대조군 외에 이들 물질이 포함된 용매대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 한다. 보조제는 대조군 또는 처리군에서 0.1 mL/L 이하의 농도가 되도록 한다.
- 2.2.5. 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수 등간격으로 정하는데 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 필요한 경우 예비시험 단계를 거쳐 농도범위를 보다 좁게 설정하여 시험할 수 있다. 농도범위는 급성독성시험 등의 자료를 토대로 가능한 한 처리군의 최고 농도가 반수치사농도(LC₅₀)값을 넘지 않도록 한다.
- 2.2.6. 시험물질의 노출방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 교환하는 반지수식 방법을 사용한다. 유수식의 경우, 시험물질 농축액과 희석수의 유속을 주기적으로

점검하여 유속의 변동범위가 10 %를 넘지 않도록 한다. 반지수식의 경우, 24 시간마다 교환하는 것을 원칙으로 하되 시험물질의 안정성에 따라 교환주기를 조절할 수 있다. 교환량은 적절하게 조절할 수 있는데 일반적으로 시험용액의 3/4을 교환한다.

2.2.7. 시험기간 동안 용존산소와 수온은 매일 측정하며, 경도와 pH는 시험시작과 종료 시 측정한다. 수온은 대조군의 한 수조에서 연속적으로 측정하는 것이 필요하다. 한편 수정란 및 부화어의 상태는 매일 관찰하고 기록하며, 만일 치사 개체가 발견되면 즉시 제거한다.

2.2.8. 수정란의 경우 알의 색깔이 불투명해지거나 배아 단계에서 심장박동이 정지하였을 경우 사망한 것으로 간주한다. 부화한 개체의 경우 호흡이 정지하거나 외부 자극에 대해 전혀 반응이 없는 것을 사망개체로 판정한다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 수정란의 무게와 시험수의 비율은 0.5 g/L를 넘지 않도록 한다. 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.3. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 범위로 시험어종에 적절한 주기를 유지하도록 한다.

2.3.4. 시험기간 동안 먹이는 공급하지 않는다.

2.3.5. 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 하되 시험 수조 사이의 온도차이와 매일 측정되는 온도차이가 각각 $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ 를 넘지 않도록 한다.

2.4. 조사항목

2.4.1. 수정란 발생단계

시험 시작 시 노출시킨 수정란의 배아 발생단계를 가능한 한 정확하게 파악하도록 한다.

2.4.2. 부화와 생존율

24 시간마다 생존개체와 부화여부를 관찰하여 정확히 기록하도록 한다. 사망한

수정란 및 치어는 즉시 제거함으로써 다른 개체에 영향을 주지 않도록 한다. 각 단계별 사망 기준은 다음과 같다.

- 수정란 : 탁해지고, 색깔의 변화가 있는 것
- 배아 : 배아 안에서 심장박동과 같은 움직임이 없는 것
- 치어 : 호흡 및 심장박동이 없거나 자극에 대해 반응이 없는 것

2.4.3. 비정상적 외형

외부 형태가 기형적인 개체를 기록하며 사망한 경우에만 수조에서 제거한다.

2.4.4. 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적 행동을 보이는 개체는 기록한다. 예로 과호흡, 비정상적 유영 또는 운동정지 등은 시험기간에 따라 일정 기간을 두고 계속해서 기록하도록 한다.

2.4.5. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 무게를 측정하는데 개체별로 측정하는 것이 바람직하나 무게 측정이 어려운 경우는 군별(시험용기별)로 측정할 수 있다. 무게는 건당 중량으로 표시한다.

2.4.6. 길이

시험이 종료되면 각각의 생존 개체에 대해 전장(머리부터 꼬리지느러미까지)를 측정하는데, 만일 꼬리지느러미의 부식 또는 손상에 따른 이상이 발생할 경우 체장(머리부터 꼬리지느러미를 제외한 몸체길이)를 측정한다.

2.4.7. 기타 다음 사항들을 관찰하도록 한다.

- (1) 누적 치사율
- (2) 시험 종료 시 건강한 치어의 수
- (3) 최초 부화시작 시기 및 부화종료 시기
- (4) 각 시험군의 24 시간 마다 부화 개체수

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 시험기간 중 시험물질 농도를 측정하는 경우, 반지수식시험에서는 교환 직전과 직후에 시험용액으로부터 분석하며, 유수식시험에 대해서는 최소한 주 1 회 분석한

다. 시험물질의 측정은 적어도 최저, 최고농도 및 중간농도의 시험용액에 대해 분석한다. 시험기간 동안 시험농도가 설정농도의 $\pm 20\%$ 이내로 유지될 경우, 시험농도는 최초 설정농도 또는 측정농도를 사용한다. 반면 $\pm 20\%$ 를 벗어나는 경우, 시험농도는 측정 수치를 적용한다.

2.5.2. 시험 기간 중 대조군의 부화율은 시험어종에 따라 다르나 최소 60 % ~ 80 % 이상이 되도록 하고, 부화 개체의 경우 시험 종료 시까지 생존율이 60 % ~ 90 % 이상 되도록 한다.

- (1) 송사리(*Oryzias latipes*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 80 %
- (2) 잉어(*Cyprinus carpio*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 75 %
- (3) 무지개송어(*Oncorhynchus mykiss*) : 부화율 66 %, 부화 후 생존율 70 %
- (4) 북미산 잉어(*Pimephales promelas*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 70 %
- (5) 제브라피쉬(*Danio rerio*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 90 %
- (6) 금붕어(*Carrassius auratus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
- (7) 블루길(*Lepomis macrochirus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 75 %
- (8) 조수 실버사이드(*Menidia peninsulae*) : 부화율 80 %, 부화 후 생존율 60 %
- (9) 청어(*Clupea harengus*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
- (10) 대구 (*Gadus morhua*) : 부화율 60 %, 부화 후 생존율 80 %
- (11) 양두모치(*Cyprinodon variegatus*) : 부화율 75 %, 부화 후 생존율 80 %

2.5.3. 유기용매 대조군에서의 영향이 희석수만 첨가한 대조군과 비교해 유의한 차이가 있어서는 안 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

(1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

2.4. 시험중

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 먹이 종류, 공급량, 공급 빈도 등

(4) 시험어류의 무게, 길이

(5) 시험시작시의 수정란 발달단계, 수집 및 수정란 취급방법

2.5. 시험조건

(1) 시험과정(노출방법, 투여수정란 수, 반복수, 시험용액의 양 등)

(2) 희석수의 수질특성(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)

(3) 시험물질 농도 및 시험물질 조제방법

(4) 시험용액의 상태(pH, 온도, 용존산소, 경도 등)

(5) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6. 시험결과

(1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항

: 기형상태, 유영상태, 최초 부화시작 시기, 부화종료 시기

(2) 대조군에서의 부화율 및 부화개체의 생존율

(3) 각 노출 농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율

(4) 각 노출 농도별 부화율 및 부화 후 치어의 생존율

(5) 시험종료 후 생존개체의 체중 및 체장

- (6) 데이터의 통계분석 처리방법
- (7) 농도-반응 자료 및 그래프
- (8) 무영향관찰농도(NOEC)와 최소영향관찰농도(LOEC)
- (9) 회기 방법을 사용하는 시험 분석의 경우, LC/ECx 및 신뢰구간(confidence interval) 및 계산에 사용된 적합한 모델의 그래프

애보트의 식(Abbott's formula)을 이용하여 수정란 또는 부화 개체의 생존율(%)을 계산하고, 이를 대조군과 비교하여 보정한다.

$$P=100-\left[\frac{C-P'}{C} \times 100\right]$$

P = 보정된 생존율(%)

P' = 시험 농도군에서 생존율(%)

C = 대조군에서의 생존율(%)

생존율을 토대로 치사농도(LC)를 적절한 통계방법을 사용해 산출하며, 부화율, 기형발생 등의 영향에 대한 영향농도(EC)를 산출한다.

- (10) 시험과정에서 시험결과에 영향을 줄 수 있는 요인의 발생 여부

제12항 어류 유생성장시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 장기간 노출이 어류 유생에 미치는 독성영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

시험기간 중 대조군과 비교하여 시험물질이 유의한 정도 ($p < 0.05$)의 영향을 나타내는 것으로 관찰되는 농도 중 가장 낮은 시험물질의 농도

2.2. 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

시험 기간 중 영향을 나타내지 않는 시험물질의 농도로서 LOEC의 바로 아래 값

2.3. 영향농도(EC_x)

조군과 비교하여 어류성장에 있어서 x %의 변화를 일으키는 시험물질의 농도

2.4 어류 개체별 성장률(Individual fish specific growth rate)

개별 개체의 초기무게에 기초한 성장률

2.5 수조에서의 평균성장률(Tank-average specific growth rate)

각 농도의 수조 당 전체 개체의 평균 성장률

2.6 가성장률(Pseudo specific growth rate)

수조 내 개체군의 초기 무게 평균값에 기초한 각 개체별 성장률

2.7 유생 (Juvenile)

본 시험에 사용되는 유생은 부화후 지수성장기에 있는 개체들로 1.4.1항의 무게 조건에 맞는 개체 사용

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험에 대한 정보

해당 시험물질에 대해 동일 어종으로 시험한 급성독성시험 결과는 유생성장시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 이밖에 물질의 구조식, 순도, 수용해도, 증기압, 광안정성, pK_a , P_{ow} 및 생분해성 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2. 장치 및 기구

- 1.2.1. 시험용 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기를 사용하며 시험조건에 적합한 충분한 크기의 수조를 사용한다.
- 1.2.2. 용존산소 및 pH 측정기
- 1.2.3. 경도 및 알칼리도 측정기
- 1.2.4. 온도 조절 및 지속적인 모니터링을 위한 장치
- 1.2.5. 정확도를 갖춘 정밀저울
- 1.2.6. 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.3. 사육수 및 희석수

- 1.3.1. 사육수와 시험용액 조제에 사용하는 희석수는 어류의 장기간 생존과 생장이 가능한 것을 사용해야 하며, 시험기간 동안 균일한 수질을 유지해야 한다.
- 1.3.2. pH는 6.5에서 8.5 사이로 유지되어야 하며, pH 변화는 ± 0.5 pH 범위 이내가 되어야 한다. 경도는 140 mg/L (CaCO_3)이상이 적합하다.
- 1.3.3. 중금속 (예 : Cu, Pb, Zn, Hg, Cd, Ni), 주요 음이온 및 양이온 (예 : Ca, Mg, Na, K, Cl, SO_4), 살충제 (예. 유기인계 또는 유기염소계 살충제), 총유기탄소 (TOC) 및 부유물

질 (SS)에 대한 측정을 주기적으로 실시하여 사육수의 수질이 일정하게 유지되고 있음을 확인한다.

1.3.4. 사육수 및 희석수의 수질은 아래 표에서 제시된 기준을 넘지 않는 것을 사용한다.

항목	기 준 치
입자물질	< 20 mg/L
총유기탄소 (Total organic carbon)	< 2 mg/L
비이온성 암모니아 (Unionized ammonia)	< 1 μ g/L
잔류염소	< 10 μ g/L
총 유기인계 살충제	< 50 ng/L
총 유기염소계 살충제 (PCB 포함)	< 50 ng/L
총 유기염소	< 25 ng/L

1.4. 시험 어류 및 조건

1.4.1. 시험에 사용하는 어종은 무지개송어를 사용하는 것이 권장되나 아래 표에 제시된 다른 종을 사용할 수 있다. 이처럼 다른 종을 사용하는 경우 합당한 근거를 제시하도록 한다.

종	시험 온도범위 (°C)	광주기 (hr)	^a 초기 개체 무게 (g)	적정 개체량 (g/L)	적정 개체수 (마리/L)
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	21 ~ 25	12 ~ 16	0.050 ~ 0.100	0.2 ~ 1.0	5 ~ 20
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	12.5 ~ 16.0	12 ~ 16	1 ~ 5	1.2 ~ 2.0	4
제브라피시 (<i>Danio rerio</i> , zebrafish)	21 ~ 25	12 ~ 16	0.050 ~ 0.100	0.2 ~ 1.0	5 ~ 10

^a 시험물질 노출시에 사용되는 시험개체의 권장무게 범위

1.4.2. 어류의 순화

시험에 사용하는 어류는 동일 모체에서 산란된 개체군에서 선택하여 사용하는 것이 바람직하다. 시험 전에 최소 2 주간 시험조건과 유사한 수질과 조도 환경에서

순화시켜야 한다. 사육 기간 및 시험 기간 중 하루에 공급하는 먹이의 최소 공급량은 어류 무게의 2 %가 되도록 하며, 가급적 4 %를 공급하는 것이 바람직하다. 순화를 시작한지 48 시간 후부터 치사어를 관찰 및 기록하여 다음의 기준에 따라 처리한다.

- ① 7 일 안에 치사율이 10 % 이상이면 사용군 전부를 폐기한다.
- ② 치사율이 5 % ~ 10 % 이면 다시 7 일간 더 사육한 후 판정한다. 이때 치사율이 5 % 이상이면 사용군 전부를 폐기한다.
- ③ 치사율이 5 % 이하이면 시험에 사용한다.

시험전 2 주 동안과 시험 기간 동안 시험 개체의 질병을 치료해서는 안 된다.

2. 시험방법

2.1. 원리

지수 성장기의 치어 무게를 측정된 후 아치사 (Sublethal) 농도 범위의 시험용액에 시험개체를 28 일간 노출시킨다. 이때 유수식 시험계를 사용하는 것이 바람직하나 그렇지 못한 경우 반지수식 시험계를 사용하여 노출한다. 먹이는 매일 공급하며, 먹이량은 시험개체의 초기 무게를 기준으로 결정하고, 14 일후에 재산정하여 공급한다. 시험이 종료된 후에는 시험개체 무게를 다시 측정한다. 성장률에 x %의 변화 (즉, EC_x : EC₁₀, EC₂₀ 또는 EC₃₀)를 가져오는 농도를 평가하기 위해 회귀 모형을 사용하여 성장률에 대한 영향을 분석한다. 다른 방법으로는 대조군과 비교하여 LOEC와 NOEC를 산출할 수도 있다.

2.2. 시험

2.2.1. 본 시험에 사용되는 시험어 각 개체의 무게는 평균 무게의 $\pm 10\%$ 를 넘지 않는 것이 이상적이며, 어떤 경우에도 개체간 차이가 25 %보다 크면 안 된다. 시험개체의 크기는 각 종별 권장되는 범위를 참고하여 선택한다.

2.2.2. 시험 24 시간 전에는 먹이를 공급하지 않는다. 시험에 사용하고자 하는 단일 군체에서 개체들을 임의로 선택하여, 일반 마취액 (예, 100 mg/L의 Tricaine methane sulphonate (MS 222) 희석액에 두 배량의 Sodium bicarbonate를 첨가하여 중화시킨 것)으로 마취시킨 후, 표면의 물기를 제거하고 무게를 측정한다. 선택된 생

물중에 제시되어 있는 적정 무게범위 내에 해당하는 개체들을 선별하여 각 시험수조에 일정 수로 분배하고, 각 수조에 들어가는 전체 개체 무게를 기록한다. 이 과정에서 시험개체에 스트레스나 상처를 최소화하기 위한 각별한 주의가 요구된다.

2.2.3. 시험 개시 28 일째에 시험어의 무게를 재 측정한다. 다만 먹이 공급량을 조절하기 위하여 시험 개시 14 일째에 무게를 측정할 수 있다.

2.2.4. 일반적으로 5개의 농도(대조군 제외)를 설정하고 공비는 3.2를 초과하지 않도록 한다. 최고 농도의 경우는 시험물질의 수용해도를 넘지 않도록 한다. 급성독성시험자료나 농도결정 시험자료가 적절한 농도를 설정하는데 도움이 될 수 있으며, 5 개 보다 적은 수의 농도를 설정하여 시험하는 경우 타당한 사유를 제시해야 한다.

대조군과 시험군에 대해 동일수의 반복군을 두는 것을 권장한다.

2.2.5. 시험용액의 농축용액 (stock solution) 조제 시 용매나 분산제 등 보조제를 사용하는 경우 보조제의 농도는 대조군 또는 처리군에서 0.1 mL/L 이하가 되도록 하고, 희석수 대조군 외에 보조제가 포함된 용매대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 한다. 그러나 가능한 보조제의 사용은 자제하도록 한다.

2.2.6. 시험용액은 농축용액을 조제한 후, 희석수로 재차 희석하여 조제한다. 수용해도가 낮은 물질의 경우 초주과 분쇄나 다른 적절한 물리적 방법을 이용하여 농축용액을 조제한다. 필요시 시험용액을 용해하기 위하여 유기용매(Ethanol, Methanol, Acetone, Dimethylformamide, Triethyleneglycol), 유화제, 분산제 (Cremophor RH40, Tween 80, 0.01 % Methylcellulose, HCO-40) 등이 사용가능 하나, 어류에 독성이 낮은 것을 우선적으로 사용한다. 아세톤과 같이 분해가 빠른 물질 또는 휘발성이 강한 물질을 사용하는 경우, 유수식 시험 시 박테리아 누적과 같은 문제가 발생할 가능성이 있으므로 특별한 주의한다.

2.2.7. 시험물질의 노출방법은 유수식 또는 일정시간에 용액을 갈아주는 반지수식 방법을 사용한다. 유수식의 경우, 시험물질 농축액과 희석수의 유속을 주기적으로 점검하여 유속의 변동범위가 10 %를 넘지 않도록 한다. 무지개송어의 경우 유수식 시험계를 이용한 시험시 물 교환 빈도는 물고기 g 당 매일 6 L의 물이 교환되도록 한다. 반지수식 시험에서는 시험액을 매일 교환하는 것이 바람직하다.

2.2.8. 시험기간 동안 모든 수조에 대하여 용존산소, pH 및 수온을 측정하여야 한다. 경도 및 알칼리도 등은 대조군 및 최고 농도의 수조에서 측정하도록 하고, 용존 산소량은 최소한 세 번(시험의 시작, 중간, 종료 시) 측정한다. 필요한 경우 염도도 동일한 방식으로 측정한다. 반지수식 시험의 경우, 용존 산소량을 최소한 일주일에 한 번 이상 또는 물 교환 전후에 측정하도록 한다. pH의 경우 반지수식 시험에서는 물교환 전후에 측정하고, 유수식 시험에서는 일주일에 한 번 이상 측정한다. 물의 경도와 알칼리도는 각 시험 시 최소 한 번 이상 측정한다. 온도는 최소 한 개의 수조에서 지속적으로 모니터링 되도록 한다.

2.3. 시험환경

2.3.1. 시험어의 적정 개체량 (g/L) 및 적정 개체 수 (마리/L)는 1.4.1항의 권고치를 참고한다. 어떤 경우든 용존산소농도는 포화농도의 60 % 이하가 되지 않도록 유지한다.

2.3.2. 광주기는 12 시간 ~ 16 시간(명) : 8 시간 ~ 12 시간(암) 범위로 시험어중에 적절한 주기를 유지하도록 한다.

2.3.3. 시험온도는 시험어종의 적정 온도를 유지하도록 하되 1.4.1항의 각 시험종별 시험 온도 범위 내에서 시험기간 동안 온도변화는 2 °C 범위 내에 있어야 한다. 또한 시험기간 중 시험수조간의 수온의 차이는 ± 1 °C를 넘지 않아야 한다.

2.3.4 시험기간 동안 먹이는 아래 표와 같이 각 시험종별로 권장되는 먹이를 매일 2 회 일일 섭취량을 두 번으로 나누어 최소한 5 시간 간격을 두고 공급한다. 무지개 송어의 경우 일일섭취량은 체중의 4 % 정도가 적당하다. 단 시험개체의 무게를 측정하기 24 시간 전에는 먹이를 주지 않는다.

시험종	권장먹이
송사리 (<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	살아있는 먹이 (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)
무지개송어 (<i>Oncorhynchus mykiss</i> , rainbow trout)	건조된 연어치어 먹이
제브라피시 (<i>Danio rerio</i> , zebrafish)	살아있는 먹이 (<i>Brachionus</i> , <i>Artemia</i>)

2.4. 조사항목

2.4.1. 무게

시험이 종료되면 모든 생존개체는 물기를 제거하고 무게를 측정하는데 개체별로 측정하거나 군별(시험용기별) 전체 무게를 측정할 수 있다. 무게는 습중량(시험 개체 표면의 물을 흡수제거한 중량)으로 표시한다. 각 개체의 특정 성장률을 확인하기 위하여 개별적으로 무게를 측정하는 경우, 실험개체의 스트레스를 최소화 할 수 있는 방법을 사용한다.

2.4.2. 비정상적 외형 및 비정상적 행동

시험기간 동안 비정상적인 외형(출혈 또는 변색 등) 또는 비정상적 행동이 나타나는 지 매일 확인하여 기록한다.

2.4.3. 치사율

시험기간 동안 매일 관찰하여 치사율을 기록하고, 치사어는 기록 후 곧 제거한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 시험 종료시 대조군에서의 치사율은 10 %를 넘지 않아야 한다.

2.5.2. 대조군에서의 평균무게의 변화는 유의성을 나타내기에 충분해야 한다. 무지개송어의 경우 28 일후 대조군 개체의 평균 무게는 초기 평균 무게의 50 %이상 증가되어야 한다.

2.5.3. 시험기간 중 시험물질 농도를 주기적으로 측정하는 경우 적어도 최저 및 최고농도에 대해 주 1 회의 분석치가 있어야 한다. 시험물질의 농도는 원칙적으로 설정농도의 80 % ~ 120 %를 유지하도록 한다. 시험물질의 측정농도와 설정농도의 차이가 20 %보다 큰 경우 시험결과는 측정농도를 기준으로 기록한다.

2.5.4. 시험결과는 측정농도를 기초로 하여 산출하는 것이 바람직하나, 설정농도나 초기 측정농도가 시험기간 동안 $\pm 20\%$ 이내로 유지됨을 증명할 수 있는 증거가 있는 경우, 설정농도나 초기 측정농도를 바탕으로 결과를 낼 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.
- 1.2. 치사율이 10 % 이상인 수조에 대해서는 성장률을 계산하지 않는다.
- 1.3. 결과산출의 주요 개념은 시간 t_1 과 t_2 사이의 특정 성장률 r 이며, 산출식은 아래와 같다.

$$r_1 = \frac{\log_e W_2 - \log_e W_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_2 = \frac{\overline{\log_e W_2} - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

$$r_3 = \frac{\log_e W_2 - \overline{\log_e W_1}}{t_2 - t_1} \times 100$$

r_1 = 어류 개체별 성장률(Individual fish specific growth rate)

r_2 = 수조에서의 평균성장률(Tank-average specific growth rate)

r_3 = 가성장률(Pseudo specific growth rate)

w_1, w_2 = t_1 및 t_2 각각에서의 시험개체 무게

$\log_e w_1$ = 시험 시작 시의 시험개체별 무게 로그 값

$\log_e w_2$ = 시험 종료 시의 시험개체별 무게 로그 값

$\overline{\log_e w_1}$ = 시험 시작 시 수조 내 전체 개체에 대한 $\log_e w_1$ 의 평균

$\overline{\log_e w_2}$ = 시험 종료 시 수조 내 전체 개체에 대한 $\log_e w_2$ 의 평균

t_1, t_2 = 시험 시작 및 종료 시점 (시간 또는 날짜)

r_1, r_2, r_3 : 0 일 ~ 28 일 사이에 계산되는 값이며, 14 일째에 측정이 이루어진 경우, 0 일 ~ 14 일 및 14 일 ~ 28 일에 대한 값이다.

1.4. 회귀모형(농도-반응 모형)을 이용한 결과의 분석

1.4.1. 본 분석방법은 시험농도와 성장률 사이의 관계를 수학적으로 계산하여 분석하는 방법으로, 이 모형을 통하여 'EC_x'를 계산할 수 있다. 본 방법을 사용하는 경우, 어류 각 개체 성장률(r_1)을 구할 필요는 없으나 대신 수조에서의 평균성장률(r_2)에 근거하여 분석할 수 있다. 특히 이 방법은 크기가 상대적으로 작은 종을 시험에 사용할 때 더욱 적합한 방법이다.

1.4.2. 농도에 따른 반응 관계를 확인하기 위하여, 수조에서의 평균성장률(r_2)을 농도에 따라 그래프로 작성한다.

1.4.3. r_2 와 농도간의 관계를 표현하기 위하여 가장 적합한 모형을 선정해야 하며, 모형 선정에 대한 합당한 근거를 제시하도록 한다.

1.4.4. 각 수조에 생존하고 있는 시험개체의 수가 동일하지 않다면 단순선형 또는 비선형모형 적용 시 동일하지 않은 집단의 크기를 허용할 수 있도록 가중치를 주어야 한다.

1.4.5. 모형적용방법은 예를 들어 EC₂₀과 그 산포도(표준오차나 신뢰구간)에 대한 평가가 가능하도록 하여야 한다.

1.5. LOEC 산출을 위한 결과의 분석

1.5.1. 만일 시험 시, 각 농도 그룹에 대하여 반복 수조군을 사용한 경우, 수조에서의 평균 성장률(r_2)에 대한 분산분석 (ANOVA)을 통하여 LOEC를 산출할 수 있으며 0.05의 확률수준에서 유의한 차이가 있는 가장 낮은 농도를 구하기 위해 각 농도 노출군에서의 평균 r 값과 대조군에서의 평균 r 값을 비교하는 Dunnett's test나 William's test와 같은 적절한 분석방법을 이용한다. 모수적 방법을 위하여 요구되는 가정이 성립하지 않는다면 비정규분포인 경우 Shapiro-Wilk's test나 이분산인 경우 Barlett's test 등의 분석을 이용하며 분산분석을 실시하기 전에 데이터를 등분산의 형태로 전환시키거나 가중치를 부여하여 분산분석을 수행하는 것을 고려한다.

1.5.2. 시험 과정에서 각 농도에 대하여 반복 수조군을 두지 않은 경우, 수조들에 대한 분산분석은 의미가 없거나 불가능하므로 이때는 가성장률(r_3)에 기초하여 분산분석을 실시한다.

1.5.3. 각 농도 시험농도군의 평균 r_3 를 대조군의 평균 r_3 와 비교할 수 있다. 그렇다면 LOEC은 이전과 동일하게 볼 수 있다. 이 방법은 각 어류 개체 간의 편차로 설명할 수 있는 것 외에는 수조 간의 편차를 용인하지도 배제하지도 않는다. 그러나 경험을 통하여 수조간의 차이는 각 개체간의 편차인 수조 내의 편차와 비교할 때 매우 작다는 것을 보여 주었다. 만약 각 어류의 개체가 분석에 포함되지 않는다면 이상치를 확인하거나 그 개체의 사용에 대한 정당성을 제공하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질

(1) 화학물질의 명칭 (CAS 번호, 일반명, 상품명)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도 또는 불순물

(4) 물리화학적 성질

2.4. 시험중

(1) 학명

(2) 입수처

(3) 순화방법, 순화기간의 관찰결과, 사육방법 (먹이 종류, 먹이량, 먹이공급 빈도 등)

(4) 길이, 무게

2.5. 시험조건

(1) 시험과정 (노출방법, 시험어의 개체량 및 개체수, 시험농도, 반복수 등)

(2) 희석수 및 시험용액의 수질특성 (pH, 온도, 용존산소, 경도 등)

(3) 시험물질 농도 및 시험물질 조제방법

(4) 시험용액에서 시험물질의 상태 및 농도에 관한 정보

(5) 먹이 종류, 공급량, 공급방법 및 횟수

2.6. 시험결과

- (1) 시험과정에서 나타난 증상 및 관찰 사항
- (2) 대조군, 시험군에서의 치사율 및 대조군의 생존율 기준 만족 여부
- (3) 시험기간 동안 시험개체 및 개체평균 무게자료, 성장률 자료
- (4) 사용된 통계분석 방법 및 타당성, 시험반복군 또는 시험개체에 근거한 통계자료, 통계분석 결과
- (5) LOEC 및 NOEC 또는 EC_x

제13항 지렁이 번식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 지렁이 번식능력에 미치는 영향을 파악하는데 그 목적이 있다. 노출 시간 동안 태어난 유충(Offspring, Juvenile)의 개체수를 조사함으로써 시험 물질의 생식능에 대한 영향 여부를 파악할 수 있다. 이외에도 성체의 사망 및 성장에 미치는 영향 등을 평가한다.

2. 정의 및 단위

2.1 치사농도(LCx, Lethal concentration for x % lethal)

대조군과 비교하여 시험을 수행한 농도 범위 안에서 x %의 치사를 나타낸 농도 (예, LC₅₀ : 반수(50 %) 치사농도).

2.2 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이($p < 0.05$)가 있는 처리군 농도 중 가장 낮은 농도

2.3 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 차이($p < 0.05$)가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도로 최소영향관찰농도(LOEC) 바로 아래 농도

2.4 표준물질(Reference substance)

독성시험이 정상적인 조건에서 수행되었는지를 확인하고 시험 생물종의 반응성에 변화가 없음을 입증하기 위해 사용하는 물질. 시험대조물질로는 주로 Carbendazim 또는 Benomyl을 사용하며 시험대조물질을 사용하여 병행 시험을 수행하는 경우에는 대조군과 동일한 반복구로 한 농도에서 시험을 수행

2.5 영향농도(ECx, Effect concentration for x % effect)

대조군과 비교하여 시험을 수행한 농도 범위 안에서 x % 의 영향을 나타낸 농도
(예, EC₅₀ : 반수(50 %) 영향농도)

2.6 생식률(Reproduction rate)

시험기간 동안 성체 한 마리당 생산된 유충수의 평균값

2.7 농도 단위

농도는 토양 건조중량에 대한 시험물질의 무게(mg/kg)로 표시

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

시험물질에 대한 지령이 급성 독성 값은 생식독성시험을 위한 유용한 정보가 될 수 있다. 이밖에 시험물질의 수용해도, P_{ow}, 증기압, 환경 중 거동(예, 광분해, 주된 사용 조건에서의 가수분해율 등) 등도 시험에 유용한 정보이다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기

유리 또는 화학적으로 불활성 재질로 된 단면적 200 cm², 1 L ~ 2 L 용량의 용기를 사용하며 공기 및 빛은 투과할 수 있으면서 지령이의 탈출은 막을 수 있는 구조의 덮개를 갖추어야 한다.

1.2.2 건조기

105 °C 이상으로 유지 가능한 것

1.2.3 입체 현미경

1.2.4 pH 측정기 및 조도 측정 장치

1.2.5 정밀저울

1.2.6 항온장치

20 °C ± 2 °C의 온도범위로 조절 및 유지 가능한 것

1.2.7 습도조절장치

덮개가 있는 시험용기를 사용할 경우 필수장치는 아님

1.2.8 배양기 또는 냉난방 장치가 설치된 사육 공간

1.2.9 핀셋 또는 고리

1.2.10 항온조

1.2.11 기타 일반 실험실 장치 및 기구

1.3 인공토양의 준비

1.3.1 본 시험에 사용되는 인공 토양의 조성은 다음과 같다. 이때, 105 °C에서 함량에 도달했을 때의 건조 무게를 기준으로 한다.

(1) 10 % 스펜그넬 피트

풍건하여 곱게 갈아 식물 잔재를 볼 수 없는 것으로 pH 5.5 ~ pH 6.0에 가까울 것

(2) 20 % 고령토(Kaolin clay)

고령석(Kolinite) 함량 30 % 이상일 것

(3) 70 % 석영사(Quartz sand)

입자크기 50 μm ~ 200 μm의 고운 모래를 50 %이상 함유할 것

(4) 0.3 % ~ 1.0 % 탄산칼슘(CaCO₃, 분말상, 분석급)

탄산칼슘을 가하여 초기 pH를 6.0 ± 0.5로 조정하며 필요한 탄산칼슘 양은 토양의 구성 성분에 따라 달라질 수 있다. 시험 직전에 토양 샘플을 채취하여 1 M KCl 또는 0.01 M CaCl₂ 용액과 혼합하여 토양의 pH를 측정한다(부록 1).

1.3.2 위의 건조 성분을 정확한 비율로 넣고 완전히 혼합한 뒤 통기가 잘되는 곳에 보관한다. 시험 시작 전에 건조된 인공토양에 최종 수분함량의 절반 정도, 즉 최대 함수량의 40 % ~ 60 %(건조중량의 50 % ± 10 %)에 해당하는 탈이온수를 가한다. 제조한 인공토양은 손으로 눌렀을 때 정치수(Standing water)나 자유수

(Free water)가 있어서는 안 된다. 인공토양의 최대 함수량은 부록 2 또는 ISO 11274(주 1) 방법에 따라 측정한다.

1.3.3 시험물질을 토양 표면에 직접 적용하거나 물 없이 혼합하는 경우, 토양을 준비할 때 최종 수분함량 전량에 해당하는 탈이온수를 추가한다. 시험물질을 탈이온수에 녹여서 토양과 혼합하는 경우에는 추가 분량의 탈이온수를 시험물질과 함께 가할 수 있다.

1.3.4 대조군 및 처리군의 토양 중 수분함량은 시험 시작 및 종료 시점에 ISO 11465 방법에 따라 측정한다. 시험 기간 동안 주기적으로 시험용기의 무게를 측정하여 토양 중 수분 함량을 측정한다.

1.3.5 대조군 및 처리군 토양의 pH는 ISO 10390 방법에 따라 측정한다(부록 1). 시험물질이 산성 혹은 염기성 물질인 경우 토양의 pH는 조절하지 않는다.

1.4 시험종 및 먹이

1.4.1 시험에 사용하는 지렁이는 *Eisenia fetida* 또는 *Eisenia andrei*이며 생태학적 정보 및 생태독성시험에 관한 자세한 정보는 주 2 ~ 주 6과 같다.

1.4.2 시험에 사용하는 지렁이는 생후 2 개월에서 1 년생으로 습중량 250 mg ~ 600 mg 정도의 성숙한 개체를 사용하며 환대(Clitellum)를 가지고 있어야 한다. 지렁이를 탈이온수 등으로 세척한 뒤 여과지로 여분의 수분을 제거하고 무게를 측정한다. 유사한 연령 분포를 갖도록 동일한 환경에서 사육한 개체 가운데에서 시험 개체를 선정하며 개체간의 연령 차이가 4 주를 넘지 않아야 한다(부록 3).

1.4.3 시험에 사용하는 지렁이는 시험 개시 전에 시험에 사용되는 종류의 인공 토양에서 하루 이상 순화시키며 시험에 사용되는 것과 동일한 먹이를 공급한다.

1.4.4 먹이로는 주로 �트밀, 우분 또는 마분 등이 이용된다. 퇴비는 사용 전에 풍건하여 분쇄한 뒤 멸균하여 공급하며 약물이나 성장 촉진제, 살충제 등 시험생물에 유해한 영향을 미칠 수 있는 물질에 오염되지 않았는지 확인하여야 한다. 새로운 배치의 먹이를 사용할 경우에는 시험에 사용하지 않는 지렁이를 이용하여 성장 및 난낭(Cocoon) 생산을 감소시키지 않는지 확인하여야 한다.

1.5 토양과 시험물질의 혼합

1.5.1 시험물질의 종류에 따라 적절한 방법으로 시험물질을 준비한다.

(1) 수용성 물질

시험 시작 직전에 시험물질을 탈이온수에 녹여 시험용액을 준비한다. 이때 한 농도에 해당되는 모든 반복구를 처리할 수 있도록 충분한 양을 준비한다. 시험용액의 조제를 용이하게 하기 위해 보조용제를 사용할 수 있다. 시험용액은 최종 수분함량(즉, 최대 함수량의 40 % ~ 60 %)에 도달하도록 조제하는 것이 편리하다. 제조한 시험용액을 토양 기질과 함께 섞고 시험용기에 넣는다.

(2) 유기용매에 녹는 비수용성 물질

시험물질을 소량의 적당한 유기용매(예, 아세톤)에 녹인 뒤 소량의 공업용 모래에 스프레이로 뿌리거나 섞어준 다음 흡 후드에서 최소 수 분 이상 건조시켜 용매를 제거한다. 시험물질을 처리한 모래를 미리 수분을 가해 둔 인공토양과 섞어준다. 적당량의 탈이온수를 더해 최종 수분 함량이 최대 함수량의 40 % ~ 60 %가 되도록 한 후 전체적으로 혼합한다.

(3) 물과 유기용매에 녹지 않는 물질

물과 유기용매 모두에 녹지 않는 시험물질의 경우, 시험용기 하나 당 10 g에 해당하는 미세한 입자의 석영사와 시험물질을 혼합한 뒤 미리 수분을 가해 둔 인공토양과 섞어준다. 적당량의 탈이온수를 더해 최종 수분 함량이 최대 함수량의 40 % ~ 60 %가 되도록 한 후 전체적으로 혼합한다.

1.5.2 농약류와 같이 토양 표면에 뿌려지는 물질의 경우, 동일한 조건으로 시험을 수행하기 위해 다음과 같은 과정으로 토양표면에 시험물질을 노출시킨다.

먼저 시험용기에 수분을 포함한 토양을 채운 뒤, 무게를 측정한 지렁이들을 넣는다. 15 분 이후에도 토양을 뚫지 않고 남아 있는 지렁이는 건강하지 않는 것으로 여겨지며, 이러한 지렁이는 제거하고 새로운 지렁이로 교환한다. 교체한 개체가 있는 경우, 지렁이의 총 무게 및 지렁이를 포함하는 시험 용기의 총 무게를 확인하기 위하여 다시 무게를 측정해 둔다.

지렁이 피부에 시험물질이 직접 노출되는 것을 막기 위하여 지렁이를 추가한 후

30 분 이상 경과한 후에 시험물질을 노출시킨다. 시험물질이 토양 표면에 골고루 뿌려지도록 적절한 스프레이 장치를 이용하여 토양 표면에 적용하며 벽 표면에 닿지 않도록 주의한다.

시험물질은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 노출하며 수용액, 유화제, 확산제의 경우 $600\text{ }\mu\text{L}/\text{m}^2 \sim 800\text{ }\mu\text{L}/\text{m}^2$ 비율로 노출시킨다. 난알이나 종자와 같은 특수한 물질의 경우에는 농사에 사용되는 방식과 동일하게 적용한다.

시험물질을 노출하기 위해 사용한 휘발성 용매가 증발될 수 있도록 1 시간 정도 시험 용기의 뚜껑을 덮지 않는다. 이때 시험개체가 탈출하지 않도록 각별한 주의를 기울인다.

2. 시험방법

2.1. 원리

일정농도의 시험물질을 함유한 인공토양에 넣은 지렁이의 생식, 성장 및 사망에 미치는 영향을 측정한다. 시험물질에 4 주간 노출시킨 뒤 성체의 사망과 성장에 미치는 영향을 관찰하여 반수치사농도(LC_{50})를 산출한다. 생식에 대한 영향은 성체를 제거하고 4 주간 더 노출시킨 다음 난낭에서 부화한 유충의 수를 계수하여 측정한다. 대조군과 비교하여 시험물질에 대한 무영향농도(NOEC) 및 영향농도(ECx)를 산출한다.

2.2 농도설정 시험

2.2.1 본시험에 사용할 시험물질의 농도 범위를 설정할 필요가 있는 경우 농도설정 시험을 실시하여 본시험에서의 농도 범위를 결정한다.

2.2.2 농도설정시험을 위한 시험물질의 농도는 1000 mg/kg , 100 mg/kg , 10 mg/kg , 1 mg/kg , 0.1 mg/kg 을 기본으로 하여 단계적으로 정한다.

2.2.3 대조군 및 처리군 각 농도 당 10 마리의 지렁이를 사용하며 반복구는 두지 않아도 된다. 시험물질에 따라 토양이 더 필요할 경우, 개체 당 인공토양 $50\text{ g} \sim 60\text{ g}$ 의 비율로 토양 및 개체를 추가 한다.

2.2.4 시험용기에 시험개체를 분배할 때 계통오차를 줄이기 위해 시험에 사용할 개체 가운데 20 마리의 무게를 무작위로 선정하여 각각의 무게를 측정하여 집단의 균질성을 확인한다. 균질성이 확인되면 지렁이 배치를 선택하고 무게를 잰 뒤 시험용기에 넣는다. 지렁이를 넣은 다음 시험용기(덮개 제외)의 무게를 측정하여 시험기간 동안 토양의 수분 함량을 체크하기 위한 기초 자료로 사용한다. 무게를 측정한 뒤 시험용기의 덮개를 덮어둔다.

2.2.5 보조용제를 사용하여 시험용액을 조제한 경우 동일한 농도의 보조용제 대조군을 설정하여 보조용제가 시험결과에 영향을 미치지 않음을 입증하여야 한다.

2.2.5 시험용기마다 시험토양을 집어넣고, 인공토양에 1 일 이상 순화시킨 지렁이를 빠른 속도로 증류수에 씻은 후 시험 농도 당 10 마리 이상을 토양표면에 놓는다. 용기는 통풍구멍이 뚫린 플라스틱 필름으로 덮어 건조를 막는다.

2.2.6 지렁이를 인공토양에 넣고 시험물질을 가한 뒤 하루 뒤부터 먹이를 공급한다. 먹이가 남아있는 경우에는 곰팡이 번식을 막기 위해 먹이 공급량을 줄인다.

2.2.7 시험온도는 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하도록 한다.

2.2.8 시험기간 중 명암주기는 16 시간(명) : 8 시간(암)으로 하며 조도는 400 렉스 ~ 800 렉스를 유지하도록 한다.

2.2.9 토양의 수분 함량을 확인하기 위해 시험기간 동안 주기적으로 시험용기의 무게(덮개 제외)를 측정하고 무게 감소가 일어난 경우 탈이온수를 공급하여 시험기간 중 수분 함량이 시험 시작 시점의 수분 함량과 비교하여 10 % 이상 차이나지 않도록 한다.

2.2.10 노출기간은 2 주로 하며, 시험 종료 후 성체의 치사율을 평가한다.

2.3 본시험

2.3.1 농도설정시험의 결과에 기초하여 농도 범위 및 반복수를 설정하되, 도출하고자하는 종말점에 따라 달리 설정한다. 가능한 한 8 주 동안의 시험기간에 걸쳐 아치사 및 치사 영향이 관찰되도록 농도를 설정한다.

(1) 무영향농도(NOEC)를 구하고자 하는 경우

최소 5 개 이상의 농도를 대수등간격으로 정하며 공비가 2.0을 넘지 않도록 한다. 처리군 및 대조군에 대해 각각 4 개와 8 개의 반복구를 둔다.

(2) 영향농도(ECx)를 구하고자 하는 경우

최소 5 개 이상의 농도를 대수등간격으로 정하며 처리군 및 대조군에 대해 각각 2 개와 6 개의 반복구를 두도록 한다. 시험농도의 공비는 구간별로 달리 정할 수 있다. 즉, 예상 영향 농도 범위에서는 1.8을 넘지 않도록 하고 그 이상 또는 이하 농도에서는 1.8을 넘을 수 있다.

(3) 무영향농도(NOEC)와 영향농도(ECx)를 동시에 구하고자 하는 경우

8 개의 농도를 대수등간격으로 정하며 공비가 1.8을 초과하지 않도록 한다. 처리군 및 대조군에 대해 각각 4 개와 8 개의 반복구를 둔다.

2.3.2 시험개시 28 일째에 살아있는 성체의 개수, 이상 행동(토양 속으로 파고들어가는 능력상실, 즉 운동능력 상실), 형태학적 변화(상처 등)를 기록한다. 지렁이를 포함하고 있는 토양을 깨끗한 용기에 옮긴 뒤 성체를 골라내고 탈이온수로 씻고 여과지로 여분의 물기를 닦아낸 뒤 무게를 측정한다. 이때 발견되지 않은 지렁이는 측정 전에 죽어서 분해된 것으로 간주한다.

2.3.3 성체를 제거하고 난 토양은 다시 시험용기에 넣고 동일한 조건에서 추가적으로 4 주간 더 노출시킨 뒤 부화된 새끼 및 알의 개수를 확인한다(부록 4).

2.3.4 먹이는 시험물질을 토양에 처리한 다음 하루 뒤부터 4 주간 시험용기 당 5 g 정도씩 주 1 회 공급하며, 28 일 이후에는 시험용기 당 5 g 정도의 먹이를 1 회 공급한 뒤 시험 종료 시까지 먹이를 공급하지 않는다.

2.3.5 시험 전 기간에 걸쳐 관찰된 모든 유해징후 및 손상을 기록한다.

2.3.6 기타 사항은 농도설정시험과 동일한 방법으로 한다.

2.4 한계시험

농도설정시험에서 최고농도(즉, 1,000 mg/kg)에서 영향이 나타나지 않을 경우, 1,000 mg/kg 농도 처리군 및 대조군으로 한계시험을 수행하며 8 개의 반복구를 둔다.

2.5 시험상의 유의사항

2.5.1 대조군이 아래의 기준에 부합되어야 시험이 성공적으로 수행된 것으로 본다.

- (1) 대조군에서 시험 종료 시 각각의 반복구(성체 지렁이 10 마리)에서 30 마리 이상의 유충이 생산되어야 한다.
- (2) 대조군에서 생식에 대한 변동계수는 30 %를 초과하지 않아야 한다.
- (3) 대조군에서 초기 4 주 노출기간 동안 성체의 치사율은 10 %를 넘지 않아야 한다.

2.5.2 시험조건 및 시험 생물종에 대한 신뢰성을 확인하기 위해 시험대조물질에 대한 무영향농도(NOEC) 및 영향농도(EC_x) 값을 제시해야 하며 시험대조물질을 이용하여 최소 1 년에 1 회 이상 확인시험을 수행한다.

2.5.3 본 시험은 시험물질의 수용해도와 관계없이 적용 가능하나 휘발성 물질(헨리 상수 또는 공기/물 분배계수가 1 이상이거나 25 °C에서 증기압이 0.0133 Pa 이상인 물질)에 대해서는 적용할 수 없다.

2.5.4 본 시험에서는 시험기간 동안 시험물질의 분해는 고려하지 않는다. 시험기간 동안 시험물질의 노출농도가 초기 농도로 유지되지 않을 수 있으므로 시험 시작 및 종료 시점에서 화학분석을 수행할 것을 권장한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 치사율

본시험 종료 후 지렁이(성체)의 치사율을 계산하고 적절한 통계적 방법(Probit법 등)을 이용하여 반수치사농도(LC₅₀)와 95 %에서의 신뢰구간을 산출한다. 얻어진 시험결과가 표준방법을 이용하여 LC₅₀을 구하기 적절하지 않은 경우(예, 치사개체가 나타난 농도가 3 개 미만인 경우), 이동평균, Trimmed Spearman-Kärber법 또는 LC₀과 LC₁₀₀의 기하평균 등 다른 방법을 이용하여 LC₅₀을 산출한다. 이와 더불어 성체 및 유충의 행동학적, 형태학적 이상을 보고서에 기록한다.

1.2 생식능

본시험 종료 후 부화한 유충의 수를 계수하여 산술평균 및 표준편차를 구한다.
적절한 통계적 방법을 이용하여 무영향관찰농도(NOEC) 및 영향농도(ECx)를 산출한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

- (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
- (2) 순도 및 불순물
- (3) 화학물질의 특성 : 옥탄올/물 분배계수, 수용해도, 증기압, 헨리상수, 거동에 관한 정보 등

2.4 시험생물

- (1) 종명, 학명 및 입수경위
- (2) 번식 조건
- (3) 연령, 크기

2.5 시험조건

- (1) 시험에 사용된 토양의 조성
- (2) 토양의 최대 수분함유 능력
- (3) 시험물질을 토양에 적용한 방법
- (4) 시험물질의 적용에 사용된 보조 용제
- (5) 시험물질 살포에 이용한 장치의 보정에 관한 내용
- (6) 시험용기의 크기 및 시험토양의 양
- (7) 시험조건 : 조도, 명암주기, 온도
- (8) 먹이 공급 일정, 시험에 사용된 먹이의 유형 및 양, 먹이 공급 날짜

(9) 시험 개시일 및 종료일의 pH 및 수분함량

2.6 시험결과

- (1) 시험개시 4 주 뒤 처리군에서 성체 치사율(%)
- (2) 시험 시작 시 각 시험용기에 들어있는 성체의 총 무게
- (3) 시험개시 4 주 뒤 각 시험 용기에서 살아있는 성체 무게의 변화(최초 무게에 대한 % 변화율)
- (4) 시험 종료 시 각 용기 당 유충의 수
- (5) 육안적, 병리학적 이상증상 및 행동학적 변화
- (6) 대조물질을 이용한 시험결과
- (7) LC₅₀, 생식능에 대한 NOEC 및/또는 ECx
- (8) 용량-반응 곡선

- 주1) ISO (International Organization for Standardization) (1992). Soil Quality -Determination of water retention characteristics -Laboratory methods, No. 11274. ISO, Genev
- 주2) SETAC (1998). Advances in Earthworm Ecotoxicology. Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., and L. Posthuma, (eds). SETAC Press, 456 pp.
- 주3) Bouché, M.B. (1972). Lombriciens de France, Ecologie et systématique. Publication de l'Institut National de la Recherche Agronomique.
- 주4) Edwards, C.A. (1983). Development of a standardized laboratory method for assessing the toxicity of chemical substances to earthworms. Report EUR 8714 EN, Commission of European Communities.
- 주5) Greig-Smith, P.W., H. Becker, P.J. Edwards and F. Heimbach (eds.) (1992). Ecotoxicology of Earthworms. Intercept.
- 주6) Edwards, C.A. and J. P. Bohlen, (1996). Biology and ecology of Earthworms, 3rd Edition. Chapman and Hall, London.

부록 1. 토양의 pH 측정

ISO DIS 10390¹⁾ (Soil Quality-Determination of pH)에 제시된 방법에 따라 토양의 pH를 측정한다.

일정량의 토양을 실온에서 약 12 시간 건조시킨다. 건조된 토양(최소 5 g)에 5 배 부피의 1 M KCl 용액 또는 0.01 M CaCl₂를 넣고 현탁액을 만든다. 현탁액을 5 분간 진탕하고 최소 2 시간 이상(24 시간 이내) 정치한다. 적당한 완충용액(예, pH 4.0, pH 7.0)을 이용하여 보정한 pH 측정기로 액층의 pH를 측정한다.

참고문헌

- (1) ISO (International Organization for Standardization) (1994). Soil Quality - Determination of pH, No. 10390. ISO, Geneve.

부록 2. 토양의 최대 함수량 측정

ISO DIS 11268-2¹⁾의 Annex C에 제시된 방법에 따라 토양의 최대 함수량을 측정한다.

적절한 시험용기에 일정량의 토양을 넣고 바닥을 물에 적신 필터페이퍼로 막은 다음 항온조에 장착된 선반에 놓는다. 물 높이가 토양의 꼭대기보다 높을 때까지 천천히 물속에 넣은 다음 3 시간 동안 방치한다. 곱게 간 석영사위에 토양이 담긴 용기를 올려놓아 2 시간 동안 배수시킨다. 이때 건조되는 것을 막기 위해 덮개가 있는 시험용기 내에서 배수시킨다. 시료의 무게를 측정한 뒤 105 °C에서 함량에 도달할 때까지 건조시킨 뒤 다시 무게를 잰다. 함수량은 다음의 식에 따라 계산한다.

$$WHC(\% \text{ of drymass}) = \frac{S - T - D}{D} \times 100$$

여기에서, S = 물로 포화된 시험물질 + 시험용기 무게 + 필터페이퍼 무게

T = 용기 무게(시험용기 무게 + 필터페이퍼 무게)

D = 건조된 시험물질 무게

참고문헌

- (1) ISO (International Organization for Standardisation) (1996). Soil Quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction, No.11268-2. ISO, Geneve.

부록 3. *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei* 배양 방법

가급적이면 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인공기후실에서 번식시킨다. 이 온도에서 지렁이는 2 개월 ~ 3 개월 후면 성숙하게 된다.

두 종의 지렁이 모두 다양한 종류의 축산 폐기물에서 번식이 가능하다. 권장되는 배지는 우분 또는 마분과 토탄의 50 : 50 혼합물이다. 우분이나 마분이 의약품이나 성장 촉진제, 살충제 또는 이와 유사하게 시험생물에 영향을 줄 수 있는 물질에 오염되지 않았는지 확인하여야 한다. 배지의 pH는 약 6 ~ 7(탄산칼슘으로 조정)이어야 하며 이온 전도도는 낮아야 한다(염분 농도 6 mg 또는 0.5 % 이내). 또한 과량의 암모니아나 동물의 소변으로 오염되어서는 안 된다. 기질은 적절한 수분을 함유해야 하며 사육 상자의 크기는 10 L ~ 15 L가 적당하다.

표준 연령 및 체중의 지렁이를 얻기 위해서는 난낭으로부터 배양을 시작하는 것이 좋다. 난낭을 생산하기 위해 새로운 배지에 성충을 넣고 14 일 ~ 28 일간 배양하여 난낭을 생산하도록 한다. 성체는 제거하고 난낭으로부터 부화한 유충은 다음 번식을 위해 사용한다. 난낭으로부터 부화한 유충은 2 개월 ~ 12 개월 후면 성체로 성숙하며 시험에 사용된다.

기질 내에서 움직이고 기질에서 탈출하려고 하지 않으며 지속적으로 번식을 하는 지렁이는 건강한 개체로 볼 수 있다. 지렁이의 움직임이 둔화되고 말단부가 노란색으로 변하면 기질이 부족함을 의미한다. 이러한 경우 새로 기질을 공급하거나 사육 밀도를 줄이는 것이 좋다.

부록 4. 난낭으로부터 부화된 유충 계수 방법

어린 유충을 수작업으로 토양 기질로부터 선별하는 작업은 시간이 걸리므로 다음 두 가지 방법을 사용할 것이 권장된다.

- (1) 시험 용기를 항온조에 넣는다(40 °C에서 시작하여 60 °C로 가온한다.). 20 분 후면 기질 표면으로 유충들이 나타나 쉽게 선별하여 계수할 수 있다.
- (2) 토탄 및 퇴비 또는 오토밀을 곱게 갈아서 토양에 첨가한 경우 Van 등이 고안한 방법에 따라 시험용 토양을 체를 이용하여 세척하는 방법을 사용한다. 직경 30 cm의 0.5 mm 체 2 개를 포개 놓는다. 시험용기의 내용물을 체에 넣고 수돗물을 강하게 틀어 세척하면 어린 유충 및 난낭은 주로 위쪽 체에 남게 된다. 이 조작을 하는 동안 유충이 수막 위에 떠 있도록 하여 유충이 체의 구멍을 통해 기어나오는 것을 막기 위해 위쪽 체의 모든 표면을 젖은 상태로 유지하는 것이 중요하다. 토양 기질을 체를 통해 세척한 뒤, 위쪽 체에 남아있는 유충 및 난낭을 씻어서 사발에 옮기고 정치한다. 속이 비어있는 난낭은 수면에 뜨고 어린 개체 및 속이 차 있는 난낭은 가라앉게 된다. 위쪽 물을 따라 버리고 어린 개체 및 난낭을 소량의 물이 있는 페트리 접시에 옮긴다. 바늘이나 핀셋을 이용하여 지렁이를 선별하여 계수한다.

경험적으로 (1)번 방법은 0.5 mm 체를 이용하여 세척한 유충을 골라내는데 적합하다.

수작업으로 유충을 선별하는 경우 모든 시료에 대해서 2 회 반복하여 측정하는 것이 좋다.

참고문헌

- (1) Van Gestel, C.A.M., W.A. van Dis, E.M. van Breemen, P.M. Sparenburg (1988). Comparison of two methods determining the viability of cocoons produced in earthworm toxicity experiments. *Pedobiologia* 32:367-371.

제14항 깔따구 독성시험(퇴적물에 시험물질을 첨가하는 시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 저서생물에 대한 영향을 평가하기 위해 담수 파리목 곤충인 깔따구류(*Chironomus* sp.)의 유충에 화학물질을 장기간 노출시킨 후 그 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 인공 퇴적물(Formulated sediment / reconstituted sediment)

자연적인 퇴적물의 물리적 조성과 유사하게 인위적으로 만든 혼합물

2.2 상층수(Overlying water)

시험 용기에서 퇴적물 위를 덮고 있는 물

2.3 공극수(Interstitial water/pore water)

퇴적물 및 토양 입자 사이의 공간을 차지하고 있는 물

2.4 시험물질 첨가 퇴적물(Spiked sediment)

시험물질을 첨가시킨 퇴적물

2.5 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 (토양)처리군 농도중 가장 낮은 농도

2.6 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도중 가장 높은 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 시험용기 : 직경 8 cm, 용량 600 mL 이상의 유리 비이커 및 유리제 용기를 사용한다.

시스템과 접촉하는 시험용기 및 기타 기구는 화학적으로 불활성한 재질로 된 것을 사용한다.

1.1.2 온도제어 장치

1.1.3 pH 측정기

1.1.4 용존산소 측정기

1.1.5 경도측정장치

1.1.6 총유기탄소 측정장치

1.1.7 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.2 퇴적물

1.2.1 시험에 사용되는 인공 퇴적물은 아래의 조건을 만족하도록 해야 한다.

(1)주요조성

성분	건조중량비(%)	조건	성상
이탄(peat)	4 ~ 5	pH 5.5 ~ pH 6.0, 공기중 건조	≤ 1 mm의 고운입자
고령토(kaolin clay)	20		kaolinite 성분 30 % 이상
석영사(quartz sand)	75 ~ 76		50 μm ~ 200 μm 사이의 입자 50 % 이상
CaCO ₃	0.05 ~ 0.1		분말
탈이온수		최종혼합물의 30 % ~ 50 %	전도도 ≤ 10 μS/cm

① 이탄(물이끼 이탄)은 식물입자가 남아있어서는 안되며 미세한 분말상태로 갈아야 한다. 이탄분말을 탈이온수에 현탁시키고 균질화시킨다. 이때 CaCO₃를 이용하여 pH가 5.5 ± 0.5가 되도록 조절한다. 이 현탁액은 20 °C ± 2 °C에서 2일간 가볍게 교반시켜 주면서 안정화시킨다. 이후 pH가 6.0 ± 0.5가 되도록 조절한다.

- (2) 최종 인공 퇴적물의 pH가 7.0 ± 0.5 가 되도록 CaCO_3 를 첨가한다.
- (3) 최종 인공 퇴적물의 유기탄소의 비율은 $2 \% \pm 0.5 \%$ 가 되도록 이탄과 석영사의 비율을 조절한다.

1.2.2 인공 퇴적물 구성요소들에 대한 공급원을 알아야 하며, 각 성분은 화학적 오염물질이 없다는 것을 확인하여야 한다. 혼합물에 물을 첨가하였을 때 퇴적물 성분이 분리(예 : 이탄 입자가 떠오르는 경우)되지 않는 경우에 한해서 건조상태의 성분들을 혼합해도 된다.

1.2.3 인공 퇴적물은 저장하였다가 사용해서는 안되며 최종 혼합물은 7 일 동안의 안정화기간이 지난 후 바로 사용하여야 한다.

1.3 희석수

1.3.1 양질의 천연수, 탈염소 처리한 수돗물이나 조제수를 사용할 수 있다. 조제수의 경우 M4 또는 M7 배양액(주 1)을 사용한다. 희석수는 사용 전 폭기시킨다.

1.3.2 희석수의 pH는 6.0 ~ 9.0, 경도는 400 mg/L(CaCO_3 로서) 미만이어야 한다. 만일 경도를 높이는 물질과 시험물질 사이의 화학반응이 예상될 경우, 경도가 낮은 물을 사용하여야 하며, 이 경우에는 M4 배양액을 사용할 수 없다.

1.3.3 희석수의 수질은 아래 표에서 제시된 기준을 넘지 않는 것을 사용하며 일년에 2 회 이상 측정하여 확인한다.

항목	기 준 치
입자물질	< 20 mg/L
총유기탄소(total organic carbon)	< 2 mg/L
비이온성 암모니아(unionized ammonia)	< 1 $\mu\text{g/L}$
CaCO_3 기준 경도	< 400 mg/L
잔류염소	< 10 $\mu\text{g/L}$
총 유기인계 살충제	< 50 ng/L
총 유기염소계 살충제 (PCB 포함)	< 50 ng/L
총 유기염소	< 25 ng/L

1.4 시험종

1.4.1 시험종으로는 *Chironomus riparius*이 권장된다. 그 외에 *Chironomus tentans*나 *Chironomus yoshimatsui*도 이용할 수 있다.

1.4.2 *Chironomus riparius*는 권장되는 배양방법에 따라 배양하여 사용한다(주 2).

1.5 시험용액 및 인공 퇴적물의 조제

1.5.1 시험물질은 시험용 퇴적물에 시험물질 용액을 직접 첨가함으로써 준비된다.

1.5.2 시험물질이 물에 녹는 경우 탈이온수로 녹인 시험물질의 농축용액(Stock solution)을 시험에 사용될 인공 퇴적물과 혼합기 또는 수작업을 통하여 섞어준다.

1.5.3 시험물질의 물 용해도가 낮은 경우 가급적 적은 양의 유기용매(헥산, 아세톤, 클로로포름 등)를 사용하여 녹인다. 이 시험용액을 하나의 시험용기에 대해 10 g의 석영사와 혼합한 후, 용매를 완전히 증발시키고 시험 비이커마다 적정량의 퇴적물과 혼합한다.

1.5.4 시험물질은 인공 퇴적물 내에 균일하게 섞여야 하며 이를 증명하기 위해 일부 표본을 채취하여 분석할 수 있다.

2. 시험방법

2.1 원리

제 1령 깔따구 유충들을 퇴적물-물 시스템에서 시험물질에 노출시킨다. 시험물질을 퇴적물에 첨가하고 계속해서 제 1령 유충들을 퇴적물과 물 농도가 안정화되어 있는 비이커에 넣는다. 깔따구의 출현과 발생률은 시험 마지막에 측정하며 최종 생존율과 무게가 요구될 경우에는 10일 후에 적절한 반복구를 사용해 측정한다. 깔따구의 출현 또는 유충의 생존 또는 성장에 대한 % 감소율을 나타내는 농도(예 : EC_{10} , EC_{50})를 구하기 위해 회귀모델을 이용하거나, 통계학적 가설검정 시험을 이용하여 무영향관찰농도(NOEC) 또는 최소영향관찰농도(LOEC)를 구한다. 시험물질의 수용해도, 증기압 및 물과 퇴적물 내에서의 안정도와 퇴적물 내에서의 분포정도를 알아야 한다. 또한, 물질의 구조식, 순도 및 분해성 등의 자료는 본 시험에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

2.2 시험의 설계 및 통계처리 방법

2.2.1 회귀모델을 이용하여 EC_x를 구하는 시험의 경우, 적어도 5 개 이상의 농도를 두고 각 농도 당 적어도 3 개의 반복구를 둔다. 농도사이의 공비는 2를 넘지 않도록 한다. 10 일된 유충의 생존율과 성장률을 평가하기 위해서는 추가적으로 반복구를 두어야 한다.

2.2.2 NOEC/LOEC를 구하는 시험의 경우, 5 개 농도를 두고 각 농도 당 적어도 4 개의 반복구를 둔다. 농도사이의 공비는 2를 넘지 않도록 한다. 5 % 신뢰수준($p = 0.05$)에서 통계적으로 대조군과의 차이가 20 %가 되도록 충분한 수의 반복구를 둔다. 유충에서 성충이 될 때까지 걸리는 발생시간의 역수인 발생율은 Dunnett-test와 Williams-test 등의 분산분석(ANOVA)를 이용하고, 성충으로의 출현율은 Cochran-Armitage, Fisher's exact 또는 Mantel-Haentzel test가 사용될 수 있다.

2.3 시험농도

시험농도의 범위를 설정하기 위하여 농도설정시험을 실시하여 본 시험에서의 농도범위를 결정한다. 일련의 농도군을 설정하되 농도 간 차이를 넓게 두고 반복군은 필요하지 않다. 최종 시험을 위한 시험농도는 농도설정시험 결과에 근거해 결정한다. 최소 5 개의 농도를 사용하고 선택해야 한다.

2.4 한계시험

예비 농도설정시험에서 어떠한 독성영향도 보이지 않는 경우 충분히 높은 농도에서 한 개의 시험농도와 대조군으로 한계시험을 수행한다. 일반적으로 1,000 mg/kg(건조중량)의 농도가 권장된다. 5 % 신뢰수준($p = 0.05$)에서 통계적으로 대조군과의 차이가 20 %가 되어야 한다. 시험군과 대조군 각각 최소한 6 개의 반복구를 둔다. 발생율과 무게의 경우 시험결과가 정규분포 및 동일분산의 조건을 만족한다면 t-검정이 통계학적 방법으로 적합하며, 정규분포 및 동일분산의 조건을 만족하지 않는 경우 Wilcoxon-Mann-Whitney test와 같은 이분산 t-검정 또는 비모수 검정 등을 사용한다. 출현율의 경우에는 Fisher exact test를 사용할 수 있다.

2.5 본시험

2.5.1 시험물질을 첨가한 퇴적물-물 시스템의 준비

퇴적물-물의 용적비가 1 : 4가 되도록 시험물질 첨가 퇴적물과 상층수를 시험 용기에 넣는다. 이때 퇴적물의 깊이는 1.5 cm ~ 3 cm 사이가 되도록 한다. 물 첨가 시 퇴적물 성분의 분리와 미세입자의 부유 현상을 막기 위해 물을 붓는 동안 퇴적물을 원형의 플라스틱 뚜껑 등으로 덮고 물을 채우고 난 후 바로 제거한다. 시험용기는 반드시 뚜껑을 덮어야 하며, 필요한 경우, 시험 기간동안 증발한 수분을 보충하여 염의 형성을 방지하기 위해 원래 양만큼 증류수나 탈이온수로 채운다.

2.5.2 안정화

퇴적물내의 시험물질이 시험환경조건 하에서 퇴적물과 물 사이에 평형이 이루어지도록 안정화 기간을 둔다. 이 기간은 퇴적물과 시험물질의 특성에 따라 수일에서 수주까지 달라지는데 일반적으로 48 시간이 권장된다. 평형기간 후에 최소한 최소 및 최대 농도군에서 상층수, 공극수 및 퇴적물 내의 시험물질 농도를 측정한다.

2.5.3 시험생물의 첨가

시험생물을 시험용기에 넣기 4 일 ~ 5 일 전에 배양액이 담긴 작은 용기에 막낳은 알을 넣는다. 이때 먹이로 적은 양의 녹조류나 어류용 분말사료(Tetra Min®, Tetra Phyll® 등)을 넣어준다. 일반적으로 알에서 유충으로 부화하기까지 걸리는 시간은 *C. riparius*의 경우 20 °C에서 2 일 ~ 3 일, *C. tentans*의 경우 23 °C에서 1 일 ~ 4 일, *C. yoshimatsui*의 경우 25 °C에서 1 일 ~ 4 일 소요된다. 유충은 보통 4 회의 탈피를 거치며 성장하는데 각 탈피기간은 4 일 ~ 8 일 이 소요된다. 시험에는 1 령(부화 후 2 일 ~ 3 일 또는 1 일 ~ 4 일)의 유충을 사용한다.

시험물질 첨가 퇴적물과 물이 담긴 시험용기에 끝이 무딘 피펫을 이용하여 20 마리의 제 1 령 유충을 넣는다. 시험농도 당 사용되는 유충의 수는 ECx를 구하는 경우 최소 60 마리, NOEC를 구하는 경우 최소 80 마리를 사용한다.

2.5.4 대조군

시험물질을 첨가하지 않은 퇴적물을 대조군으로 두도록 한다. 만일 시험물질 조제 시 용매가 사용되었다면, 퇴적물 용매 대조군에도 첨가해야 한다.

2.5.5 시험계

지수식 시험계를 사용한다. 만약 용존산소농도가 너무 낮거나, 배설물의 농도가 너무 높아지거나, 퇴적물에서 무기물질이 유출되고, pH나 물의 정도에 영향을 주는 등 시험환경에 영향을 미치거나 수질이 시험생물에 적절하지 않을 경우 반 지수식이나 유수식을 사용할 수 있다. 그러나 폭기 등 상층수의 수질을 개선할 다른 방법을 사용하여도 좋다.

2.5.6 노출기간

시험은 대조군과 시험군의 용기에 유충을 넣는 시점으로부터 시작하여 *C. riparius*와 *C. yoshimatsui*의 경우 최대 28 일, *C. tentans*의 경우 최대 65 일 동안 실시한다. 만약 성충이 일찍 발생하는 경우 대조군에서 마지막 성충이 발생한 지 최소 5 일 후에 시험을 종료한다.

2.6 시험환경 조성 및 시험 시 유의사항

2.6.1 배양 조건

시험유충을 투입한 지 24 시간 이후 시험기간 동안 시험용기 내 상층수를 약하게 폭기하여 용존산소농도가 포화농도의 60 % 이상이 되도록 한다. 폭기는 퇴적물에서 2 cm ~ 3 cm 위에 유리 재질의 파스퇴르 피펫을 고정하여 1 초에 공기 1 방울 내지 수방울이 나오도록 한다. 휘발성 물질을 시험할 경우에는 폭기하지 않을 수 있다.

시험기간 동안 일정한 온도를 유지해야 한다. *C. riparius*를 이용하는 경우 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지해야 하며, *C. tentans*와 *C. yoshimatsui*의 경우는 각각 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하도록 한다. 광주기는 16 시간(명) : 8 시간(암)으로 하고 광도는 500 Lux ~ 1,000 Lux를 유지하도록 한다.

2.6.2 먹이 공급

먹이는 어류용 분말 사료를 매일 공급하는 것을 원칙으로 하되, 최소 일주일에 3 회 이상 공급한다. 먹이는 첫 10 일 동안은 하루에 유충 한 마리당 0.25 mg ~ 0.5 mg(*C. yoshimatsui*의 경우는 0.35 mg ~ 0.5 mg)의 양을 공급한다. 그 이후에는 시험 종료 시까지 유충 한 마리당 0.5 mg ~ 1 mg을 공급한다. 곰팡이가 생기거나 대조군에서 죽는 개체가 발생되면 먹이량을 줄여야 한다. 곰팡이가 계속 발생하면 재시험을 실시한다. 만약 흡착성이 큰 시험물질(log Kow > 5)이거

나 퇴적물과의 결합력이 큰 시험물질의 경우 시험생물의 생존에 필요한 적정량의 먹이를 시험물질의 안정화 기간 이전에 인공퇴적물에 공급하여 준다. 이 경우 식물 재료를 어류용 사료 대신 사용해야 한다. 켄치풀(*Urtica dioeca*), 뽕나무(*Morus alba*), 토끼풀(*Trifolium repens*), 시금치(*Spinacia oleracea*) 등 식물의 잎 건조분말 0.5 %를 공급하여 준다.

2.6.3 시험의 유효성

- 시험 종료 시점에서 대조군의 성충 비율이 70 % 이상이어야 한다.
- *C. riparius* 및 *C. yoshimatsui*의 경우 시험 용기 내에서 대조군이 성충으로 변이되는 기간은 12 일 ~ 23 일 이내이며, *C. tentans*는 20 일 ~ 65 일 정도의 기간이 필요하다.
- 시험 종료시에 각 시험용기 내의 pH와 용존산소를 측정하여야 한다. 용존산소 농도는 시험온도에서 포화농도의 60 % 이상이어야 하며, 모든 용기에서 상층수의 pH는 6 ~ 9의 범위이어야 한다.
- 시험기간 동안 수온의 변화는 1 °C 이하이어야 한다. 물의 온도는 등온상태의 방에서 조절되며, 적절한 시간 간격을 두고 확인한다.

2.6.4 표준물질

표준물질 시험은 시험방법 및 시험조건에 대한 신뢰성을 확인하기 위해 주기적으로 실행한다. 표준물질로는 lindane, trifluralin, pentachlorophenol, cadmium chloride 및 potassium chloride 등을 사용한다.

2.7 조사항목

2.7.1 출현율

완전히 성체로 발생된 암컷과 수컷의 갈따구 개체수와 성체로 발생될 때까지의 시간을 매일 기록한다(주 3). 수컷의 경우 깃털모양의 안테나가 있다. 일주일에 최소한 세 번 관찰하고 유충의 퇴적물 밖으로의 탈출 또는 비정상적 유영 등 비정상적 행동도 기록한다. 성충으로 발생이 되면 시험용기에서 제거한다. 시험 종료 이전에 알이 관찰되는 경우 기록하고 알을 용기에서 제거한다. 또한 번데기에서 성충으로의 발생이 되지 못한 유충의 수도 기록한다.

2.7.2 성장 및 생존

10 일 동안의 유충 생존 및 성장을 관찰하여 측정하는 경우, 시험 시작시에 시험

용기를 추가로 준비하여 시험을 진행한다. 이 시험용기 내의 퇴적물을 250 μm 체로 걸러 유충만을 분리하고 분리된 유충 중 움직임이 없거나 자극에 대한 반응이 없는 것을 사망한 것으로 판별한다. 또한 시험시작시의 유충수 만큼 계수되지 않는 경우(시험 시작시에 죽은 유충은 미생물에 의해 분해될 수 있다)도 사망한 것으로 판별한다. 시험용기당 생존한 유충의 재를 뺀 건중량 (Ash free dry weight : 생물을 건조시킨 무게에서 재의 무게를 뺀 무게)을 측정하고, 시험용기당 평균적인 각 개체의 중량을 계산한다. 살아있는 유충의 경우, 각 개체 두부 (Head capsule)의 폭을 측정하여 몇 령기에 해당하는지 확인하는 것도 유용한 자료로 활용할 수 있다.

2.7.3 시험물질 농도

시험의 시작 전에 각 시험군당 최소한 하나의 시험용기로부터 퇴적물을 꺼내어 시험물질의 농도를 측정한다. 최대 및 최소농도 시험군의 상층수, 공극수 및 퇴적물 시료의 시험물질 농도를 최소한 시험시작과 종료 시에 분석하는 것이 권장된다. 공극수는 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30 분간 10,000 g의 조건으로 원심분리하여 분리하는 것이 권장된다. 만약 시험물질이 여과장치에 흡수되지 않는다면 여과하는 방법도 가능하다. 경우에 따라서는 시료의 양이 너무 적어 공극수 내의 시험물질 농도를 측정하지 못할 수도 있다.

2.7.4 물리화학적 인자

시험용기 내의 pH, 온도를 측정한다. 경도와 암모니아농도도 시험시작과 종료 시에 대조군과 최고농도 시험군의 시험용기 하나에 대해 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.
- 1.2 시험결과 나타난 영향농도는 시험시작 시 측정된 퇴적물에서의 농도로 산출한다.
- 1.3 EC_x를 산출하는 경우 반복구를 고려한 통계처리를 하여 신뢰구간을 계산하는데 있어서 각 반복구 시험용기 사이의 차이가 무시될 정도로 작은지 아니면 고려해야 하는지를 판단해야 한다.

1.4 NOEC/LOEC를 산출하는 경우 nested-ANOVA 등을 이용하여 시험용기간 차이가 고려되어야 한다.

1.5 출현율

1.5.1 출현율은 비연속적 데이터이며, 단조로운 용량-반응이 예측되는 단계적 감소 방식에서 적용되는 Cochran-Armitage test로 분석할 수 있다. 다른 경우 Fisher's exact 또는 Bonferroni-Holm으로 조정된 유의확률(p-value)을 이용한 Mantel-Haentzel test를 이용한다. 이항분포가 나타내는 것보다 동일농도 내에서 반복구 사이의 차이가 큰 증거가 있는 경우 Cochran-Armitage test나 Fisher's exact test를 사용해야 한다.

1.5.2 시험용기당 출현한 깔다구 성충의 수는 아래의 식과 같이 산출한다.

$$ER = ne/na$$

$$ER = \text{출현율}$$

$$ne = \text{시험용기당 출현한 깔다구 성충수}$$

$$na = \text{시험용기당 시험에 사용된 유충수}$$

1.5.3 출현율에 대한 EC_x는 회귀분석법을 이용하여 산출한다. 회귀분석이 어려운 경우 이동평균법(Moving average)나 단순내삽법(Simple interpolation)과 같은 비모수적(Non-parametric) 방법을 사용한다.

1.6 발생율

1.6.1 평균 발생시간은 시험시작시 유충을 투입한 시점에서부터 성체가 발생하기까지의 평균 기간이다. 이때 실제적인 발생시간을 산출하기 위해서는 시험시작시점의 유충 발달단계를 알아야 한다. 발생율은 발생시간의 역수(단위 : 1/일)이다. 연속반응으로서의 발생율에 대해서 회귀분석을 이용한 EC_x값을 산출할 수 있다.

1.6.2 아래의 식을 사용하는 경우, 관찰한 x일에 관찰된 성충의 수는 x 일과 x-1 일(l = 관찰 간격으로 보통 1 일) 사이 시간 간격의 평균시점에서 출현하는 것으로 추정한다. 시험용기당 평균 발생율(\bar{x})은 아래의 식과 같이 산출한다.

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

\bar{x} : 시험용기당 평균 발생율

i : 관찰간격 지수

m : 최대 관찰간격수

f_i : 관찰간격 i 에서 출현한 성충의 수

n_e : 시험종료시에 출현한 총 성충수 ($= \sum f_i$)

x_i : 관찰간격 i 에서 출현한 성충의 발생율

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

day_i : 시험시작 시점으로부터 관찰일

l_i : 관찰간격 i 의 기간 (일단위이며, 보통 1 일)

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 구조식, CAS번호 등)

(2) 물리화학적 특성(수용해도, 증기압, 토양 또는 퇴적물에서의 분배계수, 물에서의 안정성 등)

(3) 순도 및 시험물질의 분석자료

2.4 시험종 : (1) 종, 학명, 입수처, 배양조건

(2) 알과 유충 취급에 대한 정보

(3) 시험용기에 투입하는 시점의 생물의 연령

2.5 시험조건

(1) 사용된 퇴적물의 종류

(2) 천연 퇴적물인 경우, 퇴적물의 채취 지역에 대한 정보(오염기록, 특성, pH, 유기탄소량, C/N비율, 퇴적물의 미립자 측정 등)

(3) 인공 퇴적물인 경우, 성분 및 특성(시험시작시의 pH, 유기탄소량, 수분 등)

(4) 조제수를 사용하는 경우 시험수의 준비 및 수질특성(시험시작시의 용존산소 농도, pH, 전도도, 경도 등)

(5) 퇴적물 및 상층수의 깊이

(6) 상층수 및 공극수 부피, 공극수의 유무에 따른 젖은 퇴적물의 중량

(7) 시험용기 재료 및 크기

- (8) 퇴적물에 대한 시험물질 첨가방법 : 사용된 농도, 반복수 및 사용된 용매
- (9) 시험물질 첨가 퇴적물과 물 사이의 안정 평형화 단계 : 기간 및 조건
- (10) 배양조건 : 온도, 광주기 및 광도, 폭기(빈도 및 강도)
- (11) 먹이의 종류, 준비, 공급방법, 공급양 등

2.6 시험결과

- (1) 설정농도, 측정농도, 시험물질 분석 결과
- (2) 시험용기 내의 수질특성 : pH, 수온, 용존산소, 경도, 암모니아 농도
- (3) 증발된 시험수의 교체(해당되는 경우)
- (4) 매일 시험용기당 출현된 암수 성충의 수
- (5) 시험용기당 성충으로 발생되지 못한 유충의 수
- (6) 시험용기당 유충개체의 평균 건조중량 및 가능한 경우 령당 평균 건조중량
- (7) 시험농도 및 반복구당 성체 출현율(%)
- (8) 반복구당 완전히 성체로 탈피된 평균 발생율 및 처리율
- (9) 사용된 통계분석 방법, 통계분석 결과
- (10) EC_x, NOEC, LOEC 등의 독성값
- (11) 고찰

주 1) 배양액(M4 및 M7)의 조성

1) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 미량영양소 농축액 성분

각 농축액 I	농축액 I 농도 (mg/L, 용액)	농축액 II를 조제하기 위해 취해야하는 농축액 I의 첨가량 (mL/L)		M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도 (mg/L)	
		M4 배지	M7 배지	M4 배지	M7 배지
H ₃ BO ₃	57,190	1.0	0.25	2.86	0.715
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl	6,120	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl	1,420	1.0	0.25	0.071	0.018
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr	320	1.0	0.25	0.016	0.004
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,260	1.0	0.25	0.063	0.016
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl ₂	260	1.0	1.0	0.013	0.013
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	1.0	1.0	0.0033	0.0033
Na ₂ SeO ₃	43.8	1.0	1.0	0.0022	0.0022
NH ₄ VO ₃	11.5	1.0	1.0	0.00058	0.00058
Na ₂ EDTA·2H ₂ O*	5,000	20.0	5.0	2.5	0.625
FeSO ₄ ·7H ₂ O*	1,991	20.0	5.0	1.0	0.249

*용액은 각각 조제하여 함께 섞은 후 즉시 고압증기멸균한다.

< M7 배양액 조제 >

- 각 농축액 I을 조제하고 각 농축액 I로부터 농축액 II를 조제한다.
- 농축액 II 50 mL과 각 다량영양소 해당량을 섞고 1 L로 채워 M7 배양액을 만든다.
- 비타민 농축액은 세 가지 비타민을 탈이온수에 넣어 조제하고 사용전에 비타민 농축액 0.1 mL를 M7 배양액에 첨가한다.
- 조제된 배양액은 폭기시켜 안정화시킨다.

2) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 다량영양소 농축액 성분

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량 (mL/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도 (mg/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	293,800	1.0	293.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,600	0.5	123.3
KCl	58,000	0.1	5.8
NaHCO ₃	64,800	1.0	64.8
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50,000	0.2	10.0
NaNO ₃	2,740	0.1	0.274
KH ₂ PO ₄	1,430	0.1	0.143
K ₂ HPO ₄	1,840	0.1	0.184

3) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 비타민 농축액 성분

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액을 조제하기 위한 농축액의 첨가량 (mL/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도 (mg/L)
Thiamine hydrochloride	750	0.1	0.075
Cyanocobalamin (B ₁₂)	10	0.1	0.0010
Biotine	7.5	0.1	0.00075

주 2) C. riparius 배양방법

- 1) 미세한 석영 모래를 사육 용기 바닥에서 5 mm ~ 10 mm 깊이로 얇게 깔고 건조를 막기 위해 물을 용기에 채우고 폭기를 시킨다. 필요한 경우 물은 교환할 수 있다. 유충의 사육용기는 성체 이탈을 방지하고, 성체가 유영할 수 있으며, 산란할 수 있을 정도로 충분히 큰 용기를 사용한다.(사육용기의 최소크기 : 30 cm × 30 cm × 30 cm)

2) 사육은 실온 또는 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 일정 온도를 유지하며, 광주기는 16 : 8(light : dark) 시간과 1,000 Lux의 조도를 필요로 한다.

3) 사육수

- 일반 자연수 또는 인공수의 사용이 가능하며, 정수한 물, 탈염소 수돗물과 인공배양액(M4 또는 M7)을 일반적으로 사용 한다. 사육수는 사용 전 폭기시킨다.

4) 유충 먹이

- 어류용 사료(예 : Tetra Min®, Tetra Phyll® 등)를 수조당 250 mg/day로 매일 공급한다. 어류용 사료 1.0 g을 사육수 20 mL에 첨가하고 균질하게 혼합시킨 것을 사용 전에 흔들고 매일 수조당 5 mL씩 공급해도 된다.

- 먹이는 수질의 상태와 성장률을 고려하여 조절 공급한다.

- 녹조류(예 : *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*)는 새로운 배양 용기를 설치할 때 추가로 공급할 수 있다.

5) 성체 먹이

- 포화 자당(Sucrose) 용액에 적신 탈지면을 먹이 공급원으로 이용할 수 있다.

6) 성체의 출현(Emergence)

- $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 13 일 ~ 15 일 후에 유생 배양용기에서 성체의 출현이 나타나기 시작한다. 수컷은 깃털모양의 더듬이를 가지고 있어서 쉽게 구별된다.

7) 난 덩어리(Egg masses)

- 배양용기 내에 성체가 있다면, 배양용기를 일주일에 3 회씩 관찰하여 젤라틴성분의 난 덩어리가 존재하는지 살펴본다. 난 덩어리가 있으면 조심스럽게 제거하여, 사육수가 담긴 작은 용기로 옮긴다. 난 덩어리는 다시 새로운 배양용기에서 배양(2 개 ~ 4 개 난 덩어리/용기)하거나 독성시험에 이용한다.

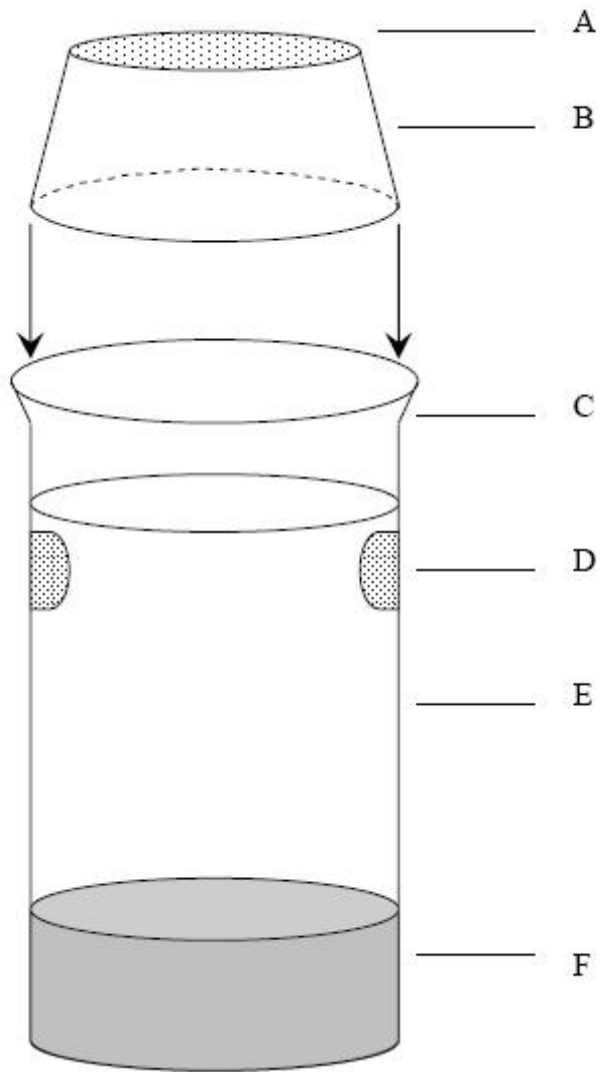
- 1 령의 유생은 2 일 ~ 3 일 후에 부화한다.

8) 새로운 배양용기 설치

- 배양이 시작되면, 일주일정도의 간격으로 유충을 배양하는 용기를 새로운 것으로 바꿔준다.

주 3) 깔따구 유충의 출현 관찰

- 유충 수집을 위한 트랩을 시험 비이커에 설치해야 한다. 이들 트랩들은 20 일째부터 시험 종료 시까지 필요하다. 트랩의 예시가 아래에 그려져 있다.



A : 나일론 스크린

D : 물 교환 스크린 포트

B : 뒤집은 플라스틱 컵

E : 물

C : 가장자리가 없는 노출된 비이커

F : 퇴적물

제15항 깔따구 독성시험(물에 시험물질을 첨가하는 시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 저서생물에 대한 영향을 평가하기 위해 담수 파리목 곤충인 깔따구류(*Chironomus* sp.)의 유충에 화학물질을 장기간 노출시킨 후 그 영향을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 인공 퇴적물(Formulated sediment / reconstituted sediment)

자연적인 퇴적물의 물리적 조성과 유사하게 인위적으로 만든 혼합물

2.2 상층수(Overlying water)

시험 용기에서 퇴적물 위를 덮고 있는 물

2.3 공극수 (Interstitial water/pore water)

퇴적물 및 토양 입자 사이의 공간을 차지하고 있는 물

2.4 시험물질 첨가 물(Spiked water)

시험물질을 첨가시킨 물

2.5 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest observed effect concentration)

대조군의 값과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 있는 처리군 농도 중 가장 낮은 농도

2.6 무영향관찰농도(NOEC, No observed effect concentration)

대조군과 처리군의 값을 비교하여 통계적으로 유의한 차이가 없는 처리군 농도 중 가장 높은 농도

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

1.1.1 시험용기 : 직경 8 cm, 용량 600 mL의 유리 비커 및 유리제 용기를 사용한다. 시스템과 접촉하는 시험용기 및 기타 기구는 화학적으로 불활성한 재질로 된 것을 사용한다.

1.1.2 온도제어 장치

1.1.3 pH 측정기

1.1.4 용존산소 측정기

1.1.5 경도측정장치

1.1.6 총유기탄소 측정장치

1.1.7 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

1.2 퇴적물

1.2.1 시험에 사용되는 인공 퇴적물은 아래의 조건을 만족하도록 해야 한다.

(1)주요조성

성분	건조중량비(%)	조건	성상
이탄(peat)	4 ~ 5	pH 5.5 ~ pH 6.0, 공기중 건조	≤ 1 mm의 고운입자
고령토(kaolin clay)	20		고령석(kaolinite) 성분 30 % 이상
석영사(quartz sand)	75 ~ 76		입자크기 50 μm ~ 200 μm 가 50 % 이상
CaCO ₃	0.05 ~ 0.1		분말
탈이온수		최종혼합물의 30 % ~ 50 %	전도도 ≤ 10 μS/cm

- ① 이탄(물끼 이탄)은 식물입자가 남아있어서는 안되며 미세한 분말상태로 갈아야 한다. 이탄분말을 탈이온수에 현탁시키고 균질화시킨다. 이때 CaCO₃를 이용하여 pH가 5.5 ± 0.5가 되도록 조절한다. 이 현탁액은 20 °C ± 2 °C에서 2 일간 가볍게 교반시켜 주면서 안정화시킨다. 이후 pH가 6.0 ± 0.5가 되도록 조절한다.

- (2) 최종 인공 퇴적물의 pH가 7.0 ± 0.5 가 되도록 CaCO_3 를 첨가한다.
- (3) 최종 인공 퇴적물의 유기탄소의 비율은 $2 \% \pm 0.5 \%$ 가 되도록 이탄과 석영사의 비율을 조절한다.

1.2.2 인공 퇴적물 구성요소들에 대한 공급원을 알아야 하며, 각 성분은 화학적 오염물질이 없다는 것을 확인하여야 한다. 혼합물에 물을 첨가하였을 때 퇴적물 성분이 분리(예 : 이탄 입자가 떠오르는 경우)되지 않는 경우에 한해서 건조상태의 성분들을 혼합해도 된다.

1.2.3 인공 퇴적물은 저장하였다가 사용해서는 안되며 최종 혼합물은 7 일 동안의 안정화기간이 지난 후 바로 사용하여야 한다.

1.3 희석수

1.3.1 양질의 천연수, 탈염소 처리한 수돗물이나 조제수를 사용할 수 있다. 조제수의 경우 M4 또는 M7 배양액(주 1)을 사용한다. 희석수는 사용 전 폭기시킨다.

1.3.2 희석수의 pH는 6.0 ~ 9.0, 경도는 400 mg/L(CaCO_3 로서) 미만이어야 한다. 만일 경도를 높이는 물질과 시험물질 사이의 화학반응이 예상될 경우, 경도가 낮은 물을 사용하여야 하며, 이 경우에는 M4 배양액을 사용할 수 없다.

1.3.3 희석수의 수질은 아래 표에서 제시된 기준을 넘지 않는 것을 사용하며 일년에 2 회 이상 측정하여 확인한다.

항목	기 준 치
입자물질	< 20 mg/L
총유기탄소(total organic carbon)	< 2 mg/L
비이온성 암모니아(unionized ammonia)	< 1 µg/L
CaCO_3 기준 경도	< 400 mg/L
잔류염소	< 10 µg/L
총 유기인계 살충제	< 50 ng/L
총 유기염소계 살충제(PCB 포함)	< 50 ng/L
총 유기염소	< 25 ng/L

1.4 시험종

1.4.1 시험종으로는 *Chironomus riparius*이 권장된다. 그 외에 *Chironomus tentans*나 *Chironomus yoshimatsui*도 이용할 수 있다.

1.4.2 *Chironomus riparius*는 권장되는 배양방법에 따라 배양하여 사용한다(주 2).

1.5 시험용액 및 인공 퇴적물의 조제

1.5.1 시험용액은 물에 시험물질을 첨가함으로써 준비된다.

1.5.2 시험물질이 물에 녹는 경우 탈이온수로 녹인 시험물질의 농축액(Stock solution)을 시험에 사용될 인공 퇴적물과 혼합기 또는 수작업을 통하여 섞어준다.

1.5.3 시험물질의 물 용해도가 낮은 경우 가급적 적은 양의 유기용매(헥산, 아세톤, 클로로포름 등)를 사용하여 녹인다. 이 시험용액을 하나의 시험용기에 대해 10 g의 석영사와 혼합한 후, 용매를 완전히 증발시키고 시험 비이커마다 적정량의 퇴적물과 혼합한다.

1.5.4 시험물질은 인공 퇴적물 내에 균일하게 섞여야 하며 이를 증명하기 위해 일부 표본을 채취하여 분석할 수 있다.

2. 시험방법

2.1 원리

제 1령 깔따구 유충들을 퇴적물-물 시험계에 있는 시험물질에 노출시킨다. 제 1령 유충들을 퇴적물-물 시험계가 있는 비이커에 넣은 후 시험물질을 물에 넣는다. 깔따구의 출현율과 성장률은 시험 마지막에 측정하며, 최종 생존율과 무게가 요구될 경우엔 10일 후에 적절한 반복구를 사용해 측정한다. 깔따구의 출현 또는 유충의 생존 또는 성장에 대한 % 감소율을 나타내는 농도(예 : EC_{10} , EC_{50})를 구하기 위해 회귀모델을 이용하거나, 통계학적 가설검정시험을 이용하여 무영향 관찰농도(NOEC) 또는 최소영향관찰농도(LOEC)를 구한다. 가설검정시험은 통계학적 시험을 이용한 대조군과 효과값의 비교가 있어야 한다. 시험물질의 수용해도, 증기압 및 물과 퇴적물 내에서의 안정도와 퇴적물 내에서의 분포정도를 알아야 한다. 또한, 물질의 구조식, 순도 및 분해성 등의 자료는 본 시험에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

2.2 시험의 설계 및 통계처리 방법

2.2.1 회귀모델을 이용하여 EC_x를 구하는 시험의 경우, 적어도 5 개 이상의 농도를 두고 각 농도 당 적어도 3 개의 반복구를 둔다. 농도사이의 공비는 2를 넘지 않도록 한다. 10 일된 유충의 생존율과 성장률을 평가하기 위해서는 추가적으로 반복구를 두어야 한다.

2.2.2 NOEC/LOEC를 구하는 시험의 경우, 5 개 농도를 두고 각 농도 당 적어도 4 개의 반복구를 둔다. 농도사이의 공비는 2를 넘지 않도록 한다. 5 % 신뢰수준($p = 0.05$)에서 통계적으로 대조군과의 차이가 20 %가 되도록 충분한 수의 반복구를 둔다. 유충에서 성충이 될 때까지 걸리는 발생시간의 역수인 발생율은 Dunnett-test와 Williams-test 등의 분산분석(ANOVA)를 이용하고, 성충으로의 출현율은 Cochran-Armitage, Fisher's exact 또는 Mantel-Haentzel test가 사용될 수 있다.

2.3 시험농도

시험농도의 범위를 설정하기 위하여 농도설정시험을 실시하여 본 시험에서의 농도범위를 결정한다. 일련의 농도군을 설정하되 농도 간 차이를 넓게 두고 반복군은 필요하지 않다. 최종 시험을 위한 시험농도는 농도설정시험 결과에 근거해 결정한다. 최소 5 개의 농도를 사용하고 선택해야 한다.

2.4 한계시험

예비 농도설정시험에서 어떠한 독성영향도 보이지 않는 경우 충분히 높은 농도에서 한 개의 시험농도와 대조군으로 한계시험을 수행한다. 추천 농도는 제시하지 않고 규제기관의 판단에 맡긴다. 5 % 신뢰수준($p = 0.05$)에서 통계적으로 대조군과의 차이가 20 %가 되어야 한다. 시험군과 대조군 각각 최소한 6 개의 반복구를 둔다. 발생율과 무게의 경우 시험결과가 정규분포 및 동일분산의 조건을 만족한다면 t-검정이 통계학적 방법으로 적합하며, 정규분포 및 동일분산의 조건을 만족하지 않는 경우 Wilcoxon-Mann-Whitney test와 같은 이분산 t-검정 또는 비모수 검정 등을 사용한다. 출현율의 경우에는 Fisher exact test를 사용할 수 있다.

2.5 본시험

2.5.1 시험물질을 첨가한 퇴적물-물 시스템의 준비

퇴적물-물의 용적비가 1 : 4가 되도록 시험물질 첨가 퇴적물과 상층수를 시험용기에 넣는다. 이때 퇴적물의 깊이는 1.5 cm ~ 3 cm 사이가 되도록 한다. 물 첨가 시 퇴적물 성분의 분리와 미세입자의 부유 현상을 막기 위해 물을 붓는 동안 퇴적물을 원형의 플라스틱 뚜껑 등으로 덮고 물을 채우고 난 후 바로 제거한다. 시험용기는 반드시 뚜껑을 덮어야 하며, 필요한 경우, 시험 기간 동안 증발한 수분을 보충하여 염의 형성을 방지하기 위해 원래 양만큼 증류수나 탈이온수로 채운다.

2.5.2 안정화

시험생물을 넣기 전에 7 일의 안정화 기간을 두고 폭기시킨다. 안정화 기간 후에 최소한 최소 및 최대 농도군에서 상층수, 공극수 및 퇴적물 내의 시험물질 농도를 측정한다.

2.5.3 시험생물의 첨가

시험생물을 시험용기에 넣기 4 일 ~ 5 일 전에 배양액이 담긴 작은 용기에 막낀 알을 넣는다. 이때 먹이로 적은 양의 녹조류나 어류용 분말사료(Tetra Min®, Tetra Phyll® 등)을 넣어준다. 일반적으로 알에서 유충으로 부화하기까지 걸리는 시간은 *C. riparius*의 경우 20 °C에서 2 일 ~ 3 일, *C. tentans*의 경우 23 °C에서 1일 ~ 4 일, *C. yoshimatsui*의 경우 25 °C에서 1 일 ~ 4 일 소요된다. 유충은 보통 4 회의 탈피를 거치며 성장하는데 각 탈피기간은 4 일 ~ 8 일이 소요된다. 시험에는 1 령(부화 후 2 일 ~ 3 일 또는 1 일 ~ 4 일)의 유충을 사용한다.

시험물질을 첨가한 퇴적물-물 시험계가 있는 시험용기에 끝이 무딘 피펫을 이용하여 20 마리의 제 1 령 유충을 넣는다. 유충을 시험용기에 첨가할 동안 상층수의 폭기는 멈춰야 하며, 유충 첨가 후 24 시간 동안 그대로 두어야 한다. 시험농도 당 사용되는 유충의 수는 EC_x를 구하는 경우 최소 60 마리, NOEC를 구하는 경우 최소 80 마리를 사용한다.

시험유충 투입 24 시간 이후, 시험물질을 상층수에 첨가하고 다시 약하게 폭기시킨다. 시험물질 용액의 적은 양을 피펫을 이용해 물의 표면에 넣는다. 그 후에 상층수를 퇴적물과 상호작용이 없도록 섞어야 한다.

2.5.4 대조군

시험물질을 첨가하지 않은 대조군을 대조군으로 두도록 한다. 만일 시험물질 조제 시 용매가 사용되었다면, 퇴적물 용매 대조군에도 첨가해야 한다.

2.5.5 시험계

지수식 시험계를 사용한다. 만약 용존산소농도가 너무 낮거나, 배설물의 농도가 너무 높아지거나, 퇴적물에서 무기물질이 유출되고, pH나 물의 경도에 영향을 주는 등 시험환경에 영향을 미치거나 수질이 시험생물에 적절하지 않는 경우 반지수식이나 유수식을 사용할 수 있다. 그러나 폭기 등 상층수의 수질을 개선할 다른 방법을 사용하여도 좋다.

2.5.6 노출기간

시험은 대조군과 시험군의 용기에 유충을 넣는 시점으로부터 노출을 시작하여 *C. riparius*와 *C. yoshimatsui*의 경우 최대 28 일, *C. tentans*의 경우 최대 65 일 동안 실시한다. 만약 성충이 일찍 발생하는 경우 대조군에서 마지막 성충이 발생한지 최소 5 일 후에 시험을 종료한다.

2.6 시험환경 조성 및 시험 시 유의사항

2.6.1 배양 조건

시험유충을 투입한 지 24 시간 이후 시험기간 동안 시험용기 내 상층수를 약하게 폭기하여 용존산소농도가 포화농도의 60 % 이상이 되도록 한다. 폭기는 퇴적물에서 2 cm ~ 3 cm 위에 유리 재질의 파스퇴르 피펫을 고정하여 1 초에 공기 1 방울 내지 수방울이 나오도록 한다. 휘발성 물질을 시험할 경우에는 폭기하지 않을 수 있다.

시험기간 동안 일정한 온도를 유지해야 한다. *C. riparius*를 이용하는 경우 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지해야 하며, *C. tentans*와 *C. yoshimatsui*의 경우는 각각 $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하도록 한다. 광주기는 16 시간(명) : 8 시간(암)으로 하고 광도는 500 Lux ~ 1,000 Lux를 유지하도록 한다.

2.6.2 먹이 공급

먹이는 어류용 분말 사료를 매일 공급하는 것을 원칙으로 하되, 최소 일주일에 3 회 이상 공급한다. 먹이는 첫 10 일 동안은 하루에 유충 한 마리당 0.25 mg ~ 0.5 mg(*C. yoshimatsui*의 경우는 0.35 mg ~ 0.5 mg)의 양을 공급한다. 그

이후에는 시험 종료시까지 유충 한 마리당 0.5 mg ~ 1 mg을 공급한다. 곰팡이가 생기거나 대조군에서 죽는 개체가 발생되면 먹이량을 줄여야 한다. 곰팡이가 계속 발생하면 재시험을 실시한다. 만약 흡착성이 큰 시험물질(log Kow > 5)이거나 퇴적물과의 결합력이 큰 시험물질의 경우 시험생물의 생존에 필요한 적정량의 먹이를 시험물질의 안정화기간 이전에 인공퇴적물에 공급하여 준다. 이 경우 식물 재료를 어류용 사료 대신 사용해야 한다. 켄치풀(*Urtica dioeca*), 뽕나무(*Morus alba*), 토끼풀(*Trifolium repens*), 시금치(*Spinacia oleracea*) 등 식물의 잎 건조분말 0.5 %를 공급하여 준다.

2.6.3 시험의 유효성

- 시험 종료 시점에서 대조군의 성충 비율이 70 % 이상이어야 한다.
- *C. riparius* 및 *C. yoshimatsui*의 경우 시험 용기 내에서 대조군이 성충으로 변이되는 기간은 12 일 ~ 23 일 이내이며, *C. tentans*는 20 일 ~ 65 일 정도의 기간이 필요하다.
- 시험 종료시에 각 시험용기 내의 pH와 용존산소를 측정하여야 한다. 용존산소 농도는 시험온도에서 포화농도의 60 % 이상이어야 하며, 모든 용기에서 상층수의 pH는 6 ~ 9의 범위이어야 한다.
- 시험기간 동안 수온의 변화는 1 °C 이하이어야 한다. 물의 온도는 등온상태의 방에서 조절되며, 적절한 시간 간격을 두고 확인한다.

2.6.4 표준 물질

표준 물질 시험은 시험방법 및 시험조건에 대한 신뢰성을 확인하기 위해 주기적으로 실행한다. 표준 물질로는 lindane, trifluralin, pentachlorophenol, cadmium chloride 및 potassium chloride 등을 사용한다.

2.7 조사항목

2.7.1 출현율

완전히 성체로 발생된 암컷과 수컷의 깔따구 개체수와 성체로 발생될 때까지의 시간을 매일 기록한다(주 3). 수컷의 경우 깃털모양의 안테나가 있다. 일주일에 최소한 세 번 관찰하고 유충의 퇴적물 밖으로의 탈출 또는 비정상적 유영 등 비정상적 행동도 기록한다. 성충으로 발생이 되면 시험용기에서 제거한다. 시험 종료 이전에 알이 관찰되는 경우, 기록을 하고 알을 용기에서 제거한다. 또한 번데기에서 성충으로의 발생이 실패한 유충의 수도 기록한다.

2.7.2 성장을 및 생존율

10 일 동안의 유충 생존 및 성장을 관찰하여 측정하는 경우, 시험 시작 시에 시험용기를 추가로 준비하여 시험을 진행한다. 이 시험용기 내의 퇴적물을 250 μm 체로 걸러 유충만을 분리하고 분리된 유충 중 움직임이 없거나 자극에 대한 반응이 없는 것을 사망한 것으로 판별한다. 또한 시험시작시의 유충수 만큼 계수 되지 않는 경우(시험 시작 시에 죽은 유충은 미생물에 의해 분해될 수 있다)도 사망한 것으로 판별한다. 시험용기당 생존한 유충의 재를 뺀 건중량(Ash free dry weight : 생물을 건조시킨 무게에서 재의 무게를 뺀 무게)을 측정하고, 시험용기 당 평균적인 각 개체의 중량을 계산한다. 살아있는 유충의 경우, 각 개체 두부(Head capsule)의 폭을 측정하여 몇령기에 해당하는지 확인하는 것도 유용한 자료로 활용할 수 있다.

2.7.3 시험물질 농도

시험의 시작 전(시험물질 적용 1 시간 이후가 선호됨)에 시험군당 최소한 하나의 시험용기로부터 공극수와 퇴적물을 꺼내어 시험물질의 농도를 측정한다. 최대 및 최소농도 시험군의 상층수, 공극수 및 퇴적물 시료의 시험물질 농도를 최소한 시험시작과 종료 시에 분석하는 것이 권장된다. 시험 시작 시에 채취한 퇴적물은 시스템에 영향을 줄 것이므로 분석적인 측정을 위해서는 시험 시작 시와 시험기간 동안에 추가적인 시험을 해야 한다. 공극수는 4 °C에서 30 분간 10,000 g의 조건으로 원심분리하여 분리하는 것이 권장된다. 만약 시험물질이 여과장치에 흡수되지 않는다면 여과하는 방법도 가능하다. 경우에 따라서는 시료의 양이 너무 적어 공극수내의 시험물질 농도를 측정하지 못할 수도 있다.

2.7.4 물리화학적 인자

시험용기 내의 pH, 온도를 측정한다. 시험수의 용존산소 농도, 경도, 암모니아 농도도 시험시작과 종료 시에 대조군과 최고농도 시험군의 시험용기 하나에 대해 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 결과를 산출하도록 하며, 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다.
- 1.2 시험결과 나타난 영향농도는 시험시작 시 상층수에서의 농도로 산출한다.
- 1.3 ECx를 산출하는 경우 반복구를 고려한 통계처리를 하여 신뢰구간을 계산하는데 있어서 각 반복구 시험용기 사이의 차이가 무시될 정도로 작은지 아니면 고려해야 하는지를 판단해야 한다.
- 1.4 NOEC/LOEC를 산출하는 경우 nested-ANOVA 등을 이용하여 시험용기간 차이가 고려되어야 한다. 보통의 ANOVA 가정에 위배되는 경우, 더 많은 Robust 검정들이 대체 검정으로 적절할 것이다.
- 1.5 출현율

1.5.1 출현율은 비연속적 데이터이며, 단조로운 용량-반응이 예측되는 단계적 감소 방식에서 적용되는 Cochran-Armitage test로 분석할 수 있다. 다른 경우 Fisher's exact 또는 Bonferroni-Holm으로 조정된 유의확률(p-value)을 이용한 Mantel-Haentz test를 이용한다. 이항분포가 나타내는 것보다 동일농도 내에서 반복구 사이의 차이가 큰 증거가 있는 경우 Cochran-Armitage test나 Fisher's exact test를 사용해야 한다.

1.5.2 시험용기당 출현한 깔다구 성충의 수는 아래의 식과 같이 산출한다.

$$ER = ne/na$$

$$ER = \text{출현율}$$

$$ne = \text{시험용기당 출현한 깔다구 성충수}$$

$$na = \text{시험용기당 시험에 사용된 유충수}$$

1.5.3 출현율에 대한 ECx는 회귀분석법을 이용하여 산출한다. 회귀분석이 어려운 경우 이동평균법(Moving average)나 단순내삽법(Simple interpolation)과 같은 비모수적(Non-parametric) 방법을 사용한다.

1.5.4 이항분포가 나타날 경우, 더 큰 표본 크기, 즉 시험용기 당 성충의 수와 성충이 되지 않은 수 모두가 5 마리를 넘는 것은 연속적 반응으로 출현율을 처리한다.

1.5.5 ANOVA를 적용하려면, 정확한 정규분포를 얻고 arcsin-sqrt-변환이나 Tukey-Freeman 변환으로 변형시켜 편차를 동등하게 만들어야 한다. Arcsin-sqrt

변환은 출현율의 제곱근의 sine값의 역수로 적용할 수 있다. 절대빈도는 Cochran-Armitage, Fisher's exact 혹은 Mantel-Haentzel test를 사용할 수 있다.

1.6 발생률

1.6.1 평균 발생시간은 시험시작 시 유충을 투입한 시점에서부터 깔따구가 실험적인 코호트(Cohort)로 출현하기까지의 평균 기간이다. 이때 실제적인 발생시간을 산출하기 위해서는 시험시작시점의 유충 발달단계를 알아야 한다. 발생률은 발생시간의 역수(단위 : 1/일)이다. 연속반응으로서의 발생률에 대해서 회귀분석을 이용한 ECx값을 산출할 수 있다.

1.6.2 아래의 식을 사용하는 경우, 관찰한 x일에 관찰된 성충의 수는 x 일과 x-1 일(l = 관찰 간격으로 보통 1 일) 사이 시간 간격의 평균시점에서 출현하는 것으로 추정한다. 시험용기당 평균 발생률 (\bar{x})은 아래의 식과 같이 산출한다.

$$\bar{x} = \sum_{i=1}^m \frac{f_i x_i}{n_e}$$

\bar{x} : 시험용기당 평균 발생률

i : 관찰간격 지수

m : 최대 관찰간격수

f_i : 관찰간격 i에서 출현한 성충의 수

n_e : 시험종료시에 출현한 총 성충수 ($= \sum f_i$)

x_i : 관찰간격 i에서 출현한 성충의 발생률

$$x_i = \frac{1}{\left(\text{day}_i - \frac{l_i}{2} \right)}$$

day_i : 시험시작 시점으로부터 관찰일

l_i : 관찰간격 i의 기간 (일단위이며, 보통 1 일)

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

- 2.3 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 구조식, CAS번호 등)
 (2) 물리화학적 특성(수용해도, 증기압, 토양 또는 퇴적물에서의 분배계수, 물에서의 안정성 등)
 (3) 순도 및 시험물질의 분석자료
- 2.4 시험종 : (1) 종, 학명, 입수처, 배양조건
 (2) 알과 유충 취급에 대한 정보
 (3) 시험용기에 투입하는 시점의 생물의 연령

2.5 시험조건

- (1) 사용된 퇴적물의 종류
- (2) 천연 퇴적물인 경우, 퇴적물의 채취 지역에 대한 정보(오염기록, 특성, pH, 유기탄소량, C/N비율, 퇴적물의 미립자 측정 등)
- (3) 인공 퇴적물인 경우, 성분 및 특성(시험시작시의 pH, 유기탄소량, 수분 등)
- (4) 조제수를 사용하는 경우 시험수의 준비 및 수질특성(시험시작시의 용존산소 농도, pH, 전도도, 경도 등)
- (5) 퇴적물 및 상층수의 깊이
- (6) 상층수 및 공극수 부피, 공극수의 유무에 따른 젖은 퇴적물의 중량
- (7) 시험용기 재료 및 크기
- (8) 퇴적물에 대한 시험물질 첨가방법 : 사용된 농도, 반복수 및 사용된 용매
- (9) 시험물질 첨가 퇴적물과 물 사이의 안정 평형화 단계 : 기간 및 조건
- (10) 배양조건 : 온도, 광주기 및 광도, 폭기(빈도 및 강도)
- (11) 먹이의 종류, 준비, 공급방법, 공급양 등

2.6 시험결과

- (1) 설정농도, 측정농도, 시험물질 분석 결과
- (2) 시험용기 내의 수질특성 : pH, 수온, 용존산소, 경도, 암모니아 농도 등
- (3) 증발된 시험수의 교체(해당되는 경우)
- (4) 매일 시험용기당 출현된 암수 성충의 수
- (5) 시험용기당 성충으로 발생되지 못한 유충의 수
- (6) 시험용기당 유충개체의 평균 건조중량 및 가능한 경우 령당 평균 건조중량
- (7) 시험농도 및 반복구당 성체 출현율(%)
- (8) 반복구당 완전히 성체로 탈피된 암/수컷의 평균 발생율 및 처리율

- (9) 사용된 통계분석 방법, 통계분석 결과
- (10) EC_x, NOEC, LOEC 등의 독성값
- (11) 고찰

주 1) 배양액(M4 및 M7)의 조성

1) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 미량영양소 농축액 성분

각 농축액 I	농축액 I 농도 (mg/L, 용액)	농축액 II를 조제하기 위해 취해야하는 농축액 I의 첨가량 (mL/L)		M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도(mg/L)	
		M4 배지	M7 배지	M4 배지	M7 배지
H ₃ BO ₃	57,190	1.0	0.25	2.86	0.715
MnCl ₂ ·4H ₂ O	7,210	1.0	0.25	0.361	0.090
LiCl	6,120	1.0	0.25	0.306	0.077
RbCl	1,420	1.0	0.25	0.071	0.018
SrCl ₂ ·6H ₂ O	3,040	1.0	0.25	0.152	0.038
NaBr	320	1.0	0.25	0.016	0.004
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1,260	1.0	0.25	0.063	0.016
CuCl ₂ ·2H ₂ O	335	1.0	0.25	0.017	0.004
ZnCl ₂	260	1.0	1.0	0.013	0.013
CoCl ₂ ·6H ₂ O	200	1.0	1.0	0.010	0.010
KI	65	1.0	1.0	0.0033	0.0033
Na ₂ SeO ₃	43.8	1.0	1.0	0.0022	0.0022
NH ₄ VO ₃	11.5	1.0	1.0	0.00058	0.00058
Na ₂ EDTA·2H ₂ O*	5,000	20.0	5.0	2.5	0.625
FeSO ₄ ·7H ₂ O*	1,991	20.0	5.0	1.0	0.249

*용액은 각각 조제하여 함께 섞은 후 즉시 고압증기멸균한다.

< M7 배양액 조제 >

- 각 농축액 I을 조제하고 각 농축액 I로부터 농축액 II를 조제한다.
- 농축액 II 50 mL과 각 다량영양소 해당량을 섞고 1 L로 채워 M7 배양액을 만든다.
- 비타민 농축액은 세가지 비타민을 탈이온수에 넣어 조제하고 사용전에 비타민 농축액 0.1 mL를 M7 배양액에 첨가한다.
- 조제된 배양액은 폭기시켜 안정화시킨다.

2) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 다량영양소 농축액 성분

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액을 조제하기 위한 각 농축액의 첨가량(mL/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도(mg/L)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	293,800	1.0	293.8
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,600	0.5	123.3
KCl	58,000	0.1	5.8
NaHCO ₃	64,800	1.0	64.8
Na ₂ SiO ₃ ·9H ₂ O	50,000	0.2	10.0
NaNO ₃	2,740	0.1	0.274
KH ₂ PO ₄	1,430	0.1	0.143
K ₂ HPO ₄	1,840	0.1	0.184

3) M4 및 M7 배양액 조제를 위한 비타민 농축액 성분

각 농축액 (또는 물질) 명	농도 (mg/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액을 조제하기 위한 농축액의 첨가량(mL/L, 용액)	M4 또는 M7 배양액에서의 최종 농도(mg/L)
Thiamine hydrochloride	750	0.1	0.075
Cyanocobalamin (B ₁₂)	10	0.1	0.0010
Biotine	7.5	0.1	0.00075

주 2) Chironomus riparius 배양방법

- 1) 미세한 석영 모래를 사육 용기 바닥에서 5 mm ~ 10 mm 깊이로 얇게 깔고 건조를 막기 위해 물을 용기에 채우고 폭기를 시킨다. 필요한 경우 물은 교환할 수 있다. 유충의 사육용기는 성체 이탈을 방지하고, 성체가 유영할 수 있으며, 산란할 수 있을 정도로 충분히 큰 용기를 사용한다.(사육용기의 최소크기 : 30 cm × 30 cm × 30 cm)

2) 사육은 실온 또는 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 일정 온도를 유지하며, 광주기는 16 : 8 (light : dark) 시간과 1000 Lux의 조도를 필요로 한다.

3) 사육수

- 일반 자연수 또는 인공수의 사용이 가능하며, 정수한 물, 탈염소 수돗물과 인공 배양액 (M4 또는 M7)을 일반적으로 사용 한다. 사육수는 사용 전 폭기시킨다.

4) 유충 먹이

- 어류용 사료 (예 : Tetra Min®, Tetra Phyll® 등)를 수조당 250 mg/day로 매일 공급한다. 어류용 사료 1.0 g을 사육수 20 mL에 첨가하고 균질하게 혼합시킨 것을 사용 전에 흔들고 매일 수조당 5 mL씩 공급해도 된다.
- 먹이는 수질의 상태와 성장률을 고려하여 조절 공급한다.
- 녹조류 (예 : *Scenedesmus subspicatus*, *Chlorella vulgaris*)는 새로운 배양 용기를 설치할 때 추가로 공급할 수 있다.

5) 성체 먹이

- 포화 자당(Sucrose) 용액에 적신 탈지면을 먹이 공급원으로 이용할 수 있다.

6) 성체의 출현(Emergence)

- $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 13 일 ~ 15 일 후에 유생 배양용기에서 성체의 출현이 나타나기 시작한다. 수컷은 깃털모양의 더듬이를 가지고 있어서 쉽게 구별된다.

7) 난 덩어리(Egg masses)

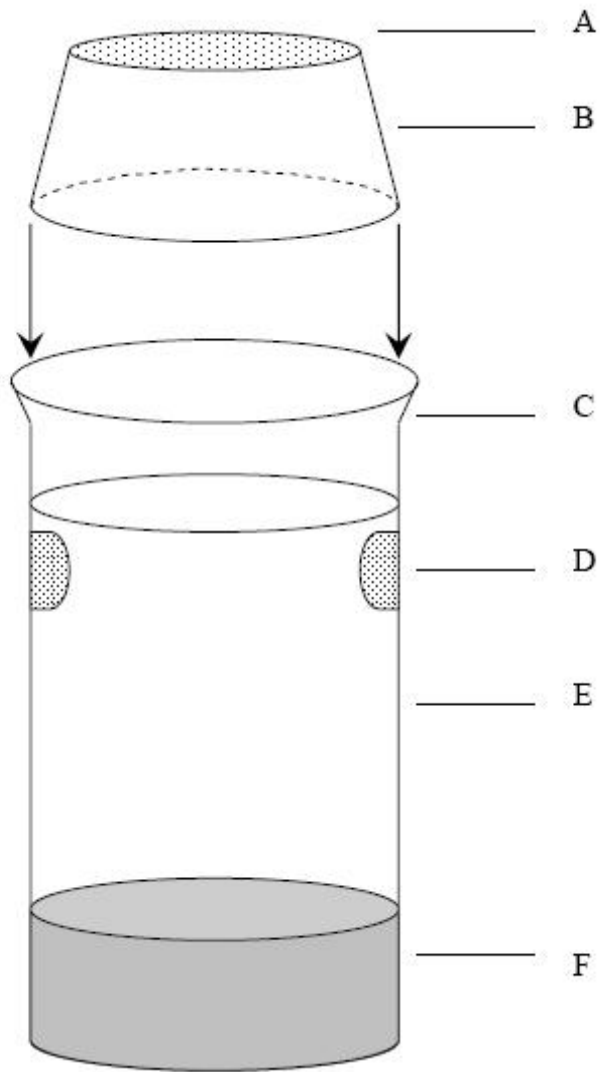
- 배양용기 내에 성체가 있다면, 배양용기를 일주일에 3회씩 관찰하여 젤라틴성분의 난 덩어리가 존재하는지 살펴본다. 난 덩어리가 있으면 조심스럽게 제거하여, 사육수가 담긴 작은 용기로 옮긴다. 난 덩어리는 다시 새로운 배양용기에서 배양(2 개 ~ 4 개 난 덩어리/용기)하거나 독성시험에 이용한다.
- 1 령의 유생은 2 일 ~ 3 일 후에 부화한다.

8) 새로운 배양용기 설치

- 배양이 시작되면, 일주일정도의 간격으로 유충을 배양하는 용기를 새로운 것으로 바꿔준다.

주 3) 깔따구 유충의 성체 출현 관찰

- 출현된 성체의 탈출을 막고 출현 여부를 관찰하기 위해 아래와 같이 비이커에 설치한다. 이러한 장치는 시험 20 일째부터 시험종료 시까지 필요하다.



A : 나일론 스크린

D : 물 교환 스크린 포트

B : 뒤집은 플라스틱 컵

E : 물

C : 가장자리가 없는 노출된 비커

F : 퇴적물

제16항 어류배아 급성독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험방법은 화학물질의 수생생물에 대한 급성 독성영향을 평가하는 방법으로, 어류 중 제브라피시(*Danio rerio*)의 배아 단계에서 화학물질의 급성 영향을 측정하는데 목적이 있다(주1). 이 시험은 수용성, 휘발성, 소수성 및 다양한 작용기작을 보이는 광범위한 물질에 대해서 적용 가능하다.

2. 정의

2.1. 상위수준 종말점(Apical endpoint)

개체수준으로 영향을 미치는 주요 관찰 항목

2.2. 포배(Blastula)

난황의 특정부분을 덮고 있는 동물극 주변의 세포형태

2.3. 피포(Epiboly)

배아의 낭배형성 단계에서 표피 세포가 대량 증식하여 배면(dorsal side)에서 배 쪽(ventral side)으로 이동하는 것으로, 외배엽 세포층이 난황의 침습과 같은 과정으로 내재화되고 난황이 배아에 혼입됨

2.4. 체절(Somite)

발달중인 척추동물 배아의 신경관 측면으로 분포된 중배엽 덩어리로, 최종적으로 진피(피부), 골격근(근위) 및 척추(흉골)로 발달

2.5. 내부 플레이트 대조군(Internal plate control)

시험 중 조제과정 또는 연구 수행자에 의해 발생된 잠재적 오염과 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 요인(예; 온도변화 등)을 식별하기 위해 시험군의 24-well 플레이트 당 4개의 well에 희석수를 채워 노출하는 내부 대조군

2.6. 반수치사 농도(LC₅₀, Median lethal concentration)

시험 생물의 50 %를 치사시키는 수용액상의 시험물질 농도이며 이때 시험기간 명기(예, 96 h-LC₅₀)

2.7. 지수식 시험(Static test)

시험 기간 중 시험용액을 교환하지 않는 시험

2.8. 반지수식 교환 시험(Semi-static renewal test)

시험 기간 중 일정기간(예, 24 시간)마다 시험용액을 새로 교환하는 시험

II. 시험

1. 원리

제브라피시의 수정란을 96시간 동안 시험물질에 노출하여, 상위수준 지표로써 24 시간마다 다음의 4가지 종말점을 기록한다; 1) 수정란의 응고(coagulation), 2) 체절 형성의 결함, 3) 난황에서 꼬리 분리의 실패, 4) 심박정지. 노출기간 종료 후 위의 4가지 종말점에 대한 영향 결과로 LC₅₀을 산출한다.

1.1 초기 고려사항

1.1.1 시험물질의 구조식, 분자량, 순도, 물과 빛에서의 안정성, pKa, Kow, 수용해도, 증기압 및 이분해성 시험 결과 (주2 또는 주3)등은 본 시험에 있어서 매우 중요한 정보이다. 용해도 및 증기압을 사용하여 Henry 상수를 계산할 수 있으며, 증발로 인한 시험물질의 손실 여부를 알 수 있다. 시험용액 내 시험물질의 농도 측정을 위해 검증된 분석방법을 이용하며, 정확도 및 검출한계를 기재해야 한다.

1.1.2 혼합물을 시험하는 경우, 그 조성들에 대한 각각의 화학적 특성을 가능한 밝혀야 한다(1.1.1항 참고). 또한 혼합물의 시험을 수행하기 전에 본 시험방법을 적용하기 어려운 경우, 얻고자 하는 목적에 적합한 결과를 산출할 수 있는지에 대한 선행 검토가 필요하다.

1.1.3 신진대사를 통해 활성화될 수 있는 물질과 관련하여, 대사산물이나 변환 생성물이 원래 화합물보다 독성이 강하다면 대사산물 또는 변환 생성물로 시험을 수행하고 이 결과를 원 시험물질의 독성결과로 사용하거나, 대사를 고려하여 다른 시험을 수행할 것을 추천한다.

1.1.4 분자량이 3kDa 이상으로 분자 구조가 큰 물질 및 부화를 지연시키는 물질의 경우, 생체 이용률이 제한되어 배아가 민감하게 반응하지 않을 것으로 예상되므로 본 시험방법은 적합하지 않을 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 어류 수조 : 화학적으로 불활성인 재질로 만들어진 용기(예, 유리)를 사용

2.1.2 산란 장치 : 유리, 스테인리스 또는 기타 불활성인 재질로 만들어진 용기

2.1.3 시험 용기 : 유리 또는 폴리스티렌 재질로 된 약 20 mm 깊이에 well 당 2.5 mL ~ 5 mL을 채울 수 있는 24-well 플레이트를 사용한다. 단, 폴리스티렌에 흡착되는 물질(예, 무극성, 높은 K_{ow} 의 평면구조 화합물)의 경우 불활성 재질(유리)을 사용한다.

2.1.4 최소 80배 배율의 도립 또는 쌍안 현미경

2.1.3 온도제어 장치 : 시험용기 노출과 현미경 관측에 사용되는 공간의 온도를 26 ± 1 °C로 유지하기 위한 인큐베이터 또는 온도 제어가 가능한 시설.

2.1.5 pH 측정기

2.1.6 용존산소 측정기

2.1.7 경도 측정기

2.1.8 전기전도도 측정기

2.1.9 기타 일반적인 실험실의 장치 및 기구

2.2 희석수

2.2.1 광범위한 지표수의 대표적 경도 수준으로 배양수를 희석하는 것을 권장한다.

희석수는 조제수(주3)를 준비하며, 수질의 경도는 100 mg/L ~ 300 mg/L (as CaCO_3)이어야 한다. 조제수를 탈이온수로 최대 5배 희석하여 최소 경도가 30 mg/L ~ 35 mg/L (as CaCO_3)인 낮은 경도 조건을 적용할 수 있다. 희석수는 시험에 사용하기 전 포기시켜 용존산소농도가 포화상태가 되도록 한다.

2.2.2 pH는 6.5 ~ 8.5 사이가 적합하며, 시험기간 동안 해당 범위 내에서 1.5 단위 이상 변하지 않아야 한다.

2.2.3 독성시험에 사용하는 희석수는 동일한 것을 사용한다.

2.3 시험 어류

2.3.1 어류 가운데 제브라피시(*Danio rerio*) 종을 사용한다.

2.3.2 산란을 위한 개체는 육안으로 식별 가능한 감염 또는 질병 증상이 없어야 하며, 산란 2개월 전부터 약물 치료를 받지 않은 개체를 사용한다. 어류 한 마리 당 1 L 용량의 사육수와 하루 12 시간 ~ 16 시간의 조명을 유지한다.

2.3.3 산란을 위한 개체의 먹이는 매일 3 ~ 5 회 건조 먹이(하루 최대량 : 개체 중량의 3 %)와 추가로 *Artemia* 종(예, Brine shrimp)의 초기유생 또는 오염되지 않은 환경에서 얻은 적절한 크기의 물벼룩류(daphnids)를 이용한다.

2.3.4 민감도 시험

양성대조물질로서 3,4-dichloroaniline(3,4-DCA)를 이용하여 어류의 민감도 시험을 전체 농도-반응 범위에서 1년에 2회 이상 수행한다. 이 시험방법을 처음 확립하는 경우 양성대조물질을 이용한 민감도 시험을 수행해야 한다.

2.3.5 수정란 채란

제브라피시의 수정란은 산란조(개별 산란 수조) 또는 대량 산란(사육 수조)을 통해 얻을 수 있다. 산란군의 수컷과 암컷(예, 2:1의 비율)은 소등되기 몇 시간 전에 산란조에 넣는다. 산란을 못하는 경우가 발생할 수 있으므로, 적어도 3개의 산란조를 병렬로 배치하는 것을 권장한다. 유전적 편향을 방지하기 위해 최소 3 개의 산란조에서 채취한 수정란을 혼합하여 무작위로 선택한다.

채란을 위해 시험전날 소등 전 또는 시험 당일 점등 전에 산란조나 사육조에 산란트랩(공극이 약 2 ± 0.5 mm인 불활성재질의 그물망)을 설치한다. 산란 및 수정은 점등 후 30분 이내 이루어지며, 조심스럽게 채란하여 회석수로 헹구어 준다.

3. 시험방법

3.1 한계시험

3.1.2 96 시간 동안 관찰한다.

3.1.3 농도군 및 양성대조군(필요 시 용매 대조군 추가)은 각각 배아 20 개, 대조군은 배아 24 개를 사용한다.

3.1.4 농도군의 치사율이 대조군(음성 또는 용매 대조군)의 치사율의 10 %를 초과하면 본시험을 수행한다. 대조군(음성 또는 용매대조군)의 치사율이 10 %를 초과하면 재시험을 수행한다.

3.1.5 다른 독성영향 증상이 관찰될 경우 이를 기록한다.

3.2 본시험

3.2.1 본시험에서는 적어도 5 개 이상의 농도(대조군 제외)를 대수등간격으로 정하며, 가능한 공비는 2.2를 초과하지 않도록 한다. 본시험에서 0 % ~ 100 % 치사율을 나타내도록 예비시험(농도결정시험)을 통해 시험물질 농도를 결정하도록 한다. 예비시험은 일반적으로 농도당 10개의 배아를 사용한다. 이때 예비시험은 시험자가 시험물질 농도설정과 시험방법을 적절하게 판단하여 수행한다.

3.2.2 각 농도의 시험용액은 시험물질 표준원액을 희석수로 희석하여 조제한다.

3.2.3 만일 시험물질 조제 시 유기용매나 분산제를 사용하는 경우는 원래의 대조군 외에 이들 물질이 포함된 용매 대조군(최고농도로 들어간 농도 기준)을 추가로 두어야 하며 유기용매 농도는 0.1 mL/L 이하가 되도록 한다.

3.2.4 대조군에는 희석수를 사용하는 음성 대조군과 내부 플레이트 대조군(internal plate control), 양성 대조군(4 mg/L의 3,4-DCA)이 반드시 포함되어야 한다. 시험물질 표준원액을 조제할 때 보조제를 사용하는 경우, 이들 물질이 포함된 용매 대조군을 추가로 두어야 한다. 내부 플레이트 대조군에서 2 개 이상의 죽은 배아가 관찰되면 해당 플레이트는 결과 산출시 제외한다. 하나의 플레이트 전체가 제외되면 독성값 산출에 제한적일 수 있으며, 특히, 용매 대조군 플레이트가 제외되는 경우는 재시험을 수행한다.

3.2.5 농도군 당 20 개의 배아가 시험에 사용된다. 한 well 당 1 개의 배아를 두며, 대조군은 24 개의 배아를 사용한다. 24-well 플레이트의 레이아웃은 그림 1.과 같다.

3.2.6 용매 대조군 사용 시, 별도의 플레이트에 20개의 용매 대조군을 둔다. 용매 대조군을 통해 용매가 부화 및 생존 시간에 유의미한 영향을 보이지 않고, 배아에 대한 다른 부작용을 일으키지 않는다는 것이 확인되어야 한다.

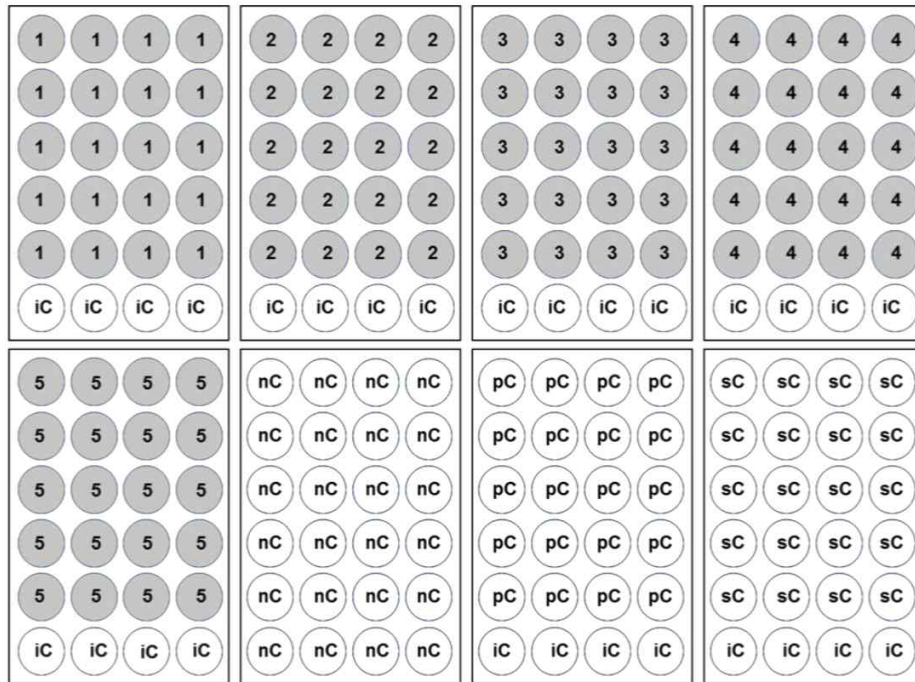


그림 1. 24-well 플레이트 레이아웃 (1-5: 5개 농도의 시험용액, nC: 대조군(희석수), iC: 내부 플레이트 대조군(희석수), pC: 양성 대조군(4 mg/L 3,4-dichloroaniline), sC: 용매 대조군)

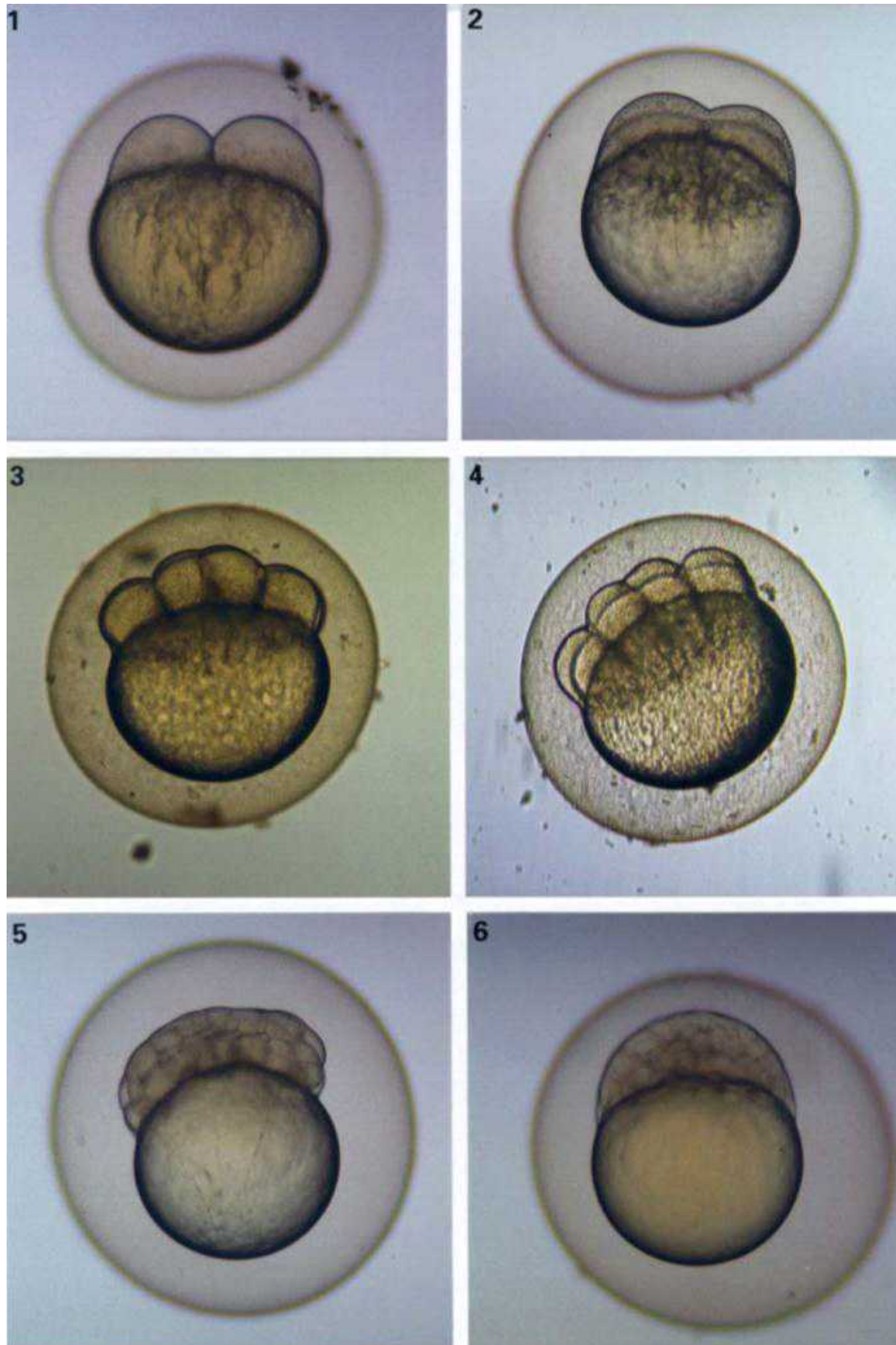


그림 2. 제브라피시(*Danio rerio*) 배아의 정상적인 발달과정: (1) 수정 후 45 분, 2 세포 단계; (2) 수정 후 60 분, 4 세포 단계; (3) 수정 후 72 분, 8 세포 단계; (4) 수정 후 90 분, 16 세포 단계; (5) 수정 후 4.7 시간, 피포(epiboly)의 시작; (6) 수정 후 5.3 시간, 약 50 % 정도의 피포가 진행됨 (주 5)

3.2.7 수정 후 가능한 빠른 시간 내에 시험을 시작하고, 96 시간 노출 후에 시험을 종료한다. 배반(blastodisc)의 분할 전 또는 늦어도 16 세포 단계(그림 2 참조)의 배아를 시험용액에 노출해야 한다. 이를 위해 수정 후 90분 이내에 대조군 및 농도군 당 필요한 배아의 2 배 이상을 무작위로 선택하여 시험용액이 담긴 불활성 용기(예, 유리)에서 노출을 시작한다.

3.2.8 현미경으로 관찰하여 난황이 시작되고, 난막(chorion) 손상이나 세포 분열의 비대칭성과 같은 이상증상을 보이지 않는 수정란을 선택하여 24-well 플레이트로 옮긴다.

3.2.9 시험시작 24 시간 전에 24-well 플레이트에 시험용액을 미리 채워 온도를 맞추고, 수정 후 180 분 이내에 한 well 당 2 mL의 새로 조제된 시험용액으로 다시 채운다.

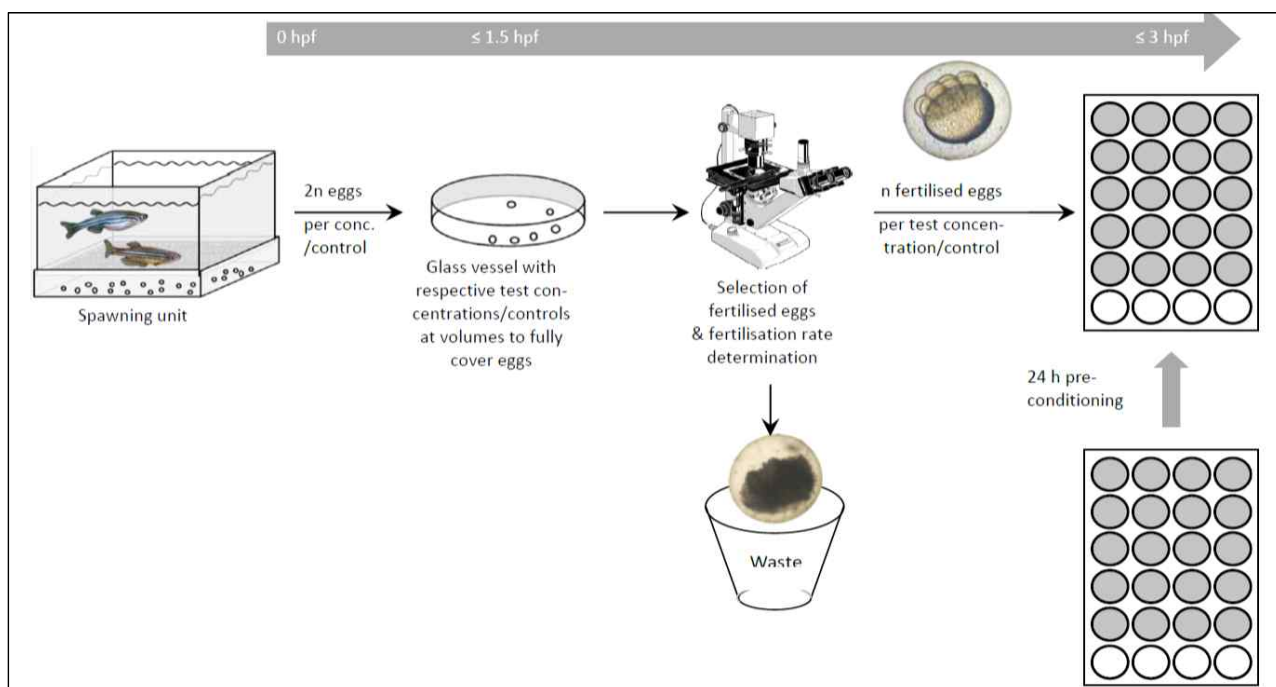


그림 3. 제브리피시 배아 급성독성시험 절차(왼쪽 ⇨ 오른쪽) : 산란 ▶ 채란 ▶ 수정 직후 유리용기에서 사전 노출 ▶ 도립/쌍안 현미경으로 아래에서 선별한 수정란을 각각의 대조군/농도군으로 준비한 24-well 플레이트로 옮김

- * n = 농도군/대조군 당 필요한 수정란 개수(이 경우, 20)
- * hpf = hours post-fertilisation (수정 후 시간)

3.2.10 시험시작 후 24 시간 마다 관찰한다. 시간별 관찰 사항은 아래 표와 같이 배아의 응고, 체절 형성의 결함, 난황에서 꼬리 분리의 실패, 심박 정지를 확인한다.

관찰사항	노출 시간			
	24 시간	48 시간	72 시간	96 시간
배아의 응고	O	O	O	O
체절 형성의 결함	O	O	O	O
난황에서 꼬리 분리의 실패	O	O	O	O
심박정지	X	O	O	O

- 배아의 응고 : 응고된 배아는 육안으로는 우윳빛이며, 현미경 관찰 시에는 어둡게 관찰된다.
- 체절 형성의 결함 : 26 ± 1 °C 에서 배양할 경우, 정상적인 배아는 24 시간 후 약 20 개의 체절이 형성되고 지속적인 좌우수축의 움직임을 보인다. 24시간 이후의 체절 형성의 결함은 발달지연에 의한 것으로 볼 수 있다. 최소 48시간 후에는 체절 형성이 이루어져야 하고, 그렇지 않다면 배아는 치사한 것으로 간주한다.
- 난황에서 꼬리 분리의 실패 : 정상적인 배아는 난황으로부터 꼬리의 분리가 관찰된다. 꼬리의 미분리는 24시간 마다 관찰하여 기록한다.
- 심박정지 : 26 ± 1 °C에서 배양 할 경우, 정상적인 배아는 48 시간 후에 심장박동을 관찰할 수 있다. 심박정지는 80 배율의 현미경에서 적어도 1 분 동안 관찰했을 때, 움직임을 없는 것을 말한다.

3.2.12 시험의 시작과 종료시점에 대조군과 최고 농도군에서 pH, 경도 및 전도도를 측정한다. 반지수식 시험은 시험용액의 교체 전, 후에 pH를 측정해야 한다. 용존산소는 대조군과 배아가 살아있는 최고 농도에서 종료시에 측정한다. 온도는 연속적으로 기록이 되는 것이 바람직하지만, 적어도 매일 1 회 이상 기록하도록 한다. 플레이트에 따라 온도가 달라지는 것이 우려될 경우, 무작위로 선택된 3 개의 플레이트에서 온도를 측정한다.

3.3. 유의사항

3.3.1 시험의 타당성 기준

시험이 적합하게 수행된 것을 입증하기 위해 다음의 타당성 기준을 만족해야 한다.

- 채란한 모든 알의 수정률은 시험 배치에서 70 % 이상이어야 한다.
- 수온은 시험기간 중 시험 용기에서 26 ± 1 °C로 유지해야 한다.
- 96 시간 노출 종료 시
 - 대조군(및 용매 대조군)에서 배아의 생존율이 90 % 이상이어야 한다.
 - 양성 대조군(4.0 mg/L 3,4-DCA)에서 치사율은 최소 30 %가 되어야 한다.
 - 대조군(및 용매 대조군)의 부화율은 80 % 이상이어야 한다.
 - 대조군 및 최고 농도의 용존산소 농도는 포화농도의 80 % 이상이어야 한다.

3.3.2 시험용액 조제 시 권장 범위의 pH(6.5 ~ 8.5)가 유지되지 않을 경우에는 시험 시작 전 pH 조절을 수행한다. 이때 시험물질 표준원액 농도의 변화는 최소화해야 하며 화학반응이나 시험물질의 침전 등이 일어나지 않도록 한다. pH의 조절은 염산(HCl, Hydrochloric acid)과 수산화나트륨(NaOH, Sodium hydroxide)을 사용하는 것이 바람직하다.

3.3.3 시험도중 시험개체에 영향을 미칠 수 있는 방해요소(예를 들어, 시험용액 교체 시, 배아가 소량의 시험 용액에 노출되어 건조되는 상황에 놓여있는 등)를 피하도록 한다.

3.3.4 시험기간 중 시험용액 내 시험물질 농도를 확인하기 위해 적절한 분석방법을 이용하여 아래와 같이 농도를 측정한다. 시험기간 동안 시험물질의 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 %로 유지되어야 한다.

- 지수식 시험에서 시험 시작과 종료 시점에 가급적 모든 농도군(최소한 최고 시험 농도와 최저 시험농도)의 시험 물질의 농도를 측정한다.
- 반지수식 교환 시험에서 시험용액의 주기적 교체(예, 24 시간 간격)로 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 수 있는 경우, 시험 시작과 종료 시점 및 시험용액의 교체 전/후에 최소한 최고 및 최저농도에서 시험물질의 농도를 측정한다.

- 노출농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지될 가능성이 없는 경우, 지수식, 반지수식 교환 시험에 대해 상기 정한 시점에 모든 시험 농도를 측정한다.

3.3.5 원칙적으로 시험결과는 측정농도로 산출한다. 시험기간 동안 시험물질 농도가 설정농도나 측정한 초기농도의 $\pm 20\%$ 이내일 경우, 시험결과는 시험물질 설정농도 또는 초기 측정농도를 근거로 산출할 수 있다. 농도가 설정농도의 80 % ~ 120 % 이내로 유지되지 않을 경우 측정농도의 기하평균으로 결과를 산출하여 설정농도와 같이 기술한다.

3.3.6 분석을 위한 용액의 용량이 충분하지 않을 경우, 시험 용액의 병합 또는 동일한 재질의 24-well 플레이트와 동일한 부피 대 표면적 비율을 갖는 용기로 대체할 수 있다.

Ⅲ. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

본시험이 종료되면 적절한 통계적 방법을 사용하여 급성독성값(LC₅₀)과 95 % 신뢰구간을 구하며 보고서에는 통계적 방법을 명시하여야 한다. 통계 계산 시, 플레이트의 각 well을 반복구로 계산한다. 관찰사항 중 적어도 하나가 양성인 배아의 백분율을 시험농도에 대해 계산한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3. 시험물질 :

- 단일 성분 물질(mono-constituent substance)
 - (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물
 - (4) 물리화학적 특성(안정성, 용해도 정보 등)

- 다성분 물질(multi-constituent substance), UVCBs, 혼합물

- (1) 가능한 자체 화학적 식별 이름 (단일 성분 물질 참고)
- (2) 구성 요소의 물리화학적 특성
- (3) 구성 요소의 성분

2.4. 시험중 : (1) 학명 및 계통

- (2) 수정란의 수집 방법 및 관리

2.5. 시험조건 : (1) 시험시작일 및 종료일, 시험기간

- (2) 시험절차 및 관련 세부사항(노출방법, 사용 개체수, 반복수, 시험 용액량, 광주기 등)
- (3) 회석수의 수질특성(pH, 경도, 수온, 전도도, 용존산소 등)
- (4) 96 시간 시작 및 종료 시점의 시험용액의 용존산소농도, pH (반 지수식의 경우 시험용액 교환 전후 모든 항목을 측정), 경도, 온도 및 전도도
- (5) 시험물질 노출농도(설정농도, 측정농도)와 반복구, 시험물질 농도 분석에 대한 사항(회수율과 LOQ 등)
- (6) 시험용액 조제방법
- (7) 용매 사용에 대한 정당화 및 용매 선택에 대한 이유
- (8) 수정율
- (9) 부화율

2.6. 시험결과 : (1) 시험기간 동안 0 % 치사율이 나타난 최고농도와 100 % 치사율이 나타난 최저 농도

- (2) 각 노출농도별 누적치사 개체수 및 누적치사율
- (3) LC₅₀ 값과 95 % 신뢰구간
- (4) LC₅₀ 값을 구하는 통계적 과정
- (5) 농도-반응 그림표
- (6) 대조군에서의 치사율
- (7) 4가지 관찰항목 각각의 결과

(8) 시험과정에서 나타난 이상증상

(9) 시험과정에서 시험 결과에 영향을 줄 수 있는 요인

2.7. 시험방법에서 이탈된 내용, 연구결과의 편차에 관한 상세 설명

- 주 1) OECD, 2013, Guidelines for the testing of chemicals - Fish embryo acute toxicity (FET) test, Test guideline No. 236, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- 주 2) OECD, 1992, Guidelines for the Testing of Chemicals - Ready Biodegradability, Test Guideline No. 301, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris.
- 주 3) OECD, 2006, Guidelines for the Testing of Chemicals - Ready Biodegradability, CO₂ in sealed vessels, Test Guideline No. 310, Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris
- 주 4) ISO, 1996, International Standards. Water quality - Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)], ISO 7346-3: Flow-through method. Available: [<http://www.iso.org>].
- 주 5) Braunbeck, T., Lammer, E., 2006. Detailed review paper "Fish embryo toxicity assays". UBA report under contract no. 20385422 German Federal Environment Agency, Berlin. 298 pp.

제4장 분해성 및 농축성 시험분야

제1항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해되기 전후 용존 유기탄소량의 차이를 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성이고 물에 대한 용해도가 100 mg/L 이상 이어야 하며 시험물질의 탄소함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이 시험법은 제4장 제5항의 “미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(II)”과 유사하지만 더 많은 양의 미생물을 사용할 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 1 차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화되는 것

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도

(DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 '10 일 창'을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 10 mg/L ~ 40 mg/L 사이에서 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 공기를 공급하면서 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건 또는 산란광조건에서 28 일간 배양한다. 시험 기간 중 일정 시간 간격으로 용존유기탄소 분석을 실시하여 생분해도를 계산한다. 생분해도는 초기 용존유기탄소 농도에 대한 접종원 바탕시험군으로 보정한 감소율로 나타낸다. 또한 1차 생분해도는 배양의 처음과 끝에 모화합물(Parent compound)에 대한 화학분석으로 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 용존유기탄소 분석에 필요한 용량에 따라 250 mL ~ 2,000 mL의 삼각플라스크를 사용한다. 플라스크는 각 시험 전에 알코올성 염산 등으로 철저히 세척하고 행균 후 건조시켜야 한다.

2.1.2 진탕기

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

2.1.5 용존산소 측정장비

2.1.6 원심분리기

2.1.7 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous)	27.50 g
또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌다이아민사아세트산나트륨염(EDTA Disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다.
기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용하여야 한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액 원액 A를 10 mL 취하여 800 mL 물에 섞은 후 원액 B, C, D를 각 1 mL씩 첨가하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질(Reference compound)

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N , Aniline), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$, Sodium acetate), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$, Sodium benzoate) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

물질의 용해도가 1 g/L를 초과하는 경우 시험물질이나 표준물질 1 g ~ 10 g을 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다. 또는 기초배양액에 직접 시험물질이나 표준물질을 첨가하고 완전히 용해되도록 조제한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 0.2 μm ~ 0.45 μm 막 여과장치를 사용하여 멸균 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 멸균제 + 시험물질 [흡착 대조군]

플라스크 8 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 접종원은 3.2항을 참고하여 플라스크 6을 제외한 모든 플라스크에 적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 8에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4로 조정한다.

2.7.4 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 2 L 플라스크에 800 mL 기초배양액 첨가

- 최종 혼합물 내 시험물질 농도가 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L이 되도록 시험물질 표준원액 첨가

- 적당량의 접종원 첨가
- 플라스크내 용액이 최종적으로 1 L가 되도록 기초배양액으로 채운다.

2.8 시험조건

- 2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L
- 2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid) 또는 ≤ 100 mL/L 2차 방류수
- 2.8.3 시험온도 : $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- 2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2
- 2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 방법 중 1개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성 상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 놓아두거나 $1,100 \times \text{g}$ 로 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다. 부유물질 농도가 1 L 당 3 g ~ 5 g이 되도록 기초배양액으로 농축된 슬러지를 희석시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과하거나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 8에 접종원을 소량씩 넣는다. 이때 접종원 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 시험에 필요한 설치를 모두 준비하고 진탕기에 넣기 전에 초기 용존유기탄소 농도 측정을 위해 각 플라스크에서 시료를 채취한다(주 1).

3.3.2 시료 채취를 마친 플라스크는 알루미늄 호일로 입구를 막고 진탕기에 넣어 주며, 암실, $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 공기를 공급한다.

3.3.3 시험기간 동안 정해진 시간 간격으로 각 플라스크로부터 두 번씩 시료의 용존유기탄소 농도를 측정한다. 플라스크 1, 2(시험물질군)와 플라스크 3, 4(접종원 바탕시험군)의 용존유기탄소 농도를 동시에 측정해야 한다.

- 3.3.4 채취한 시료는 막여과장치로 여과한 후 초기의 20 mL 여과액은 버리고, 나머지 여과액의 용존유기탄소량을 분석한다. 단, 이 때 사용하는 용존유기탄소 분석기는 초기 용존유기탄소 농도의 10 % 이하 까지 정확하게 측정할 수 있어야 한다. 여과하거나 원심분리한 시료는 즉시 분석하거나 일정기간 보관 후 분석한다.
- 3.3.5 10 일 창에서 용존유기탄소 감소비율을 확인할 수 있도록 충분한 수의 시료를 채취한다. 시료 채취 후 바로 분석을 수행하는 경우에는 분석 결과에 따라 다음 시료 채취 시간을 결정한다.
- 3.3.6 시료 채취 후 바로 분석을 하지 않고 보관하는 경우, 시료채취는 매일 혹은 이틀에 한번 씩 채취한다. 시료의 보관은 2 °C ~ 4 °C에서 최대 48 시간 이내에 분석해야 하고 장기간 보관해야 하는 경우는 -18 °C 이하로 보관한다.
- 3.3.7 시료를 채취할 때 플라스크로부터 가능한 최소량을 채취하고 용존유기탄소 농도를 측정한다. 실험과정 중의 증발 손실을 보충하기 위해 시료 채취 전에 손실된 양만큼의 물을 첨가해 주고, 플라스크 벽면에 붙은 물질이 재용해 또는 재부유되도록 잘 섞어준다.
- 3.3.8 시험이 종료되고 분석을 실시할 경우, 상대적으로 적은 수의 측정값으로 생분해 곡선을 그리려면 맨 마지막 시료부터 분석한다. 만약 마지막 시료에서 생분해가 일어나지 않았다면 더 이상 분석할 필요는 없다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험결과는 (주 3)의 양식을 참고하여 작성한다.
- 1.2 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

모든 농도는 실험으로 측정한 값이다.

1.3 비생물 분해도(%) 산출법

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

$C_{s(0)}$: 0일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

$C_{s(t)}$: t일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

1.4 시험이 적합성 기준을 만족시켰다면 플라스크 1, 2의 평균을 이용하여 분해과정을 도표로 나타내고, 10 일 창을 표시한다. 정체기(Plateau), 시험종료 또는 10 일 창 마지막에서의 용존유기탄소 감소율을 기록한다.

1.5 시험물질의 화학분석자료가 있는 경우 1차 생분해도를 기록한다.

1.6 독성대조군(플라스크 8)의 총 용존유기탄소 분해율이 14 일 내에 35 % 미만이라면 시험물질이 미생물활성을 억제하는 물질이라고 추정할 수 있다(주 2). 이러한 시험은 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도의 시험물질을 처리하거나, 부유물질이 30 mg/L를 넘지 않는 수준에서 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하거나 혹은 두 조건을 모두 적용하여 시험을 다시 실시한다.

2. 시험의 적합성

2.1 정체기, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이는 20 % 미만이어야 한다.

2.2 표준물질의 용존유기탄소 감소에 의한 분해도는 14 일 이내에 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 비생물 분해도(%)

(5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도

(6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)

(7) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 3) 용존유기탄소 감소량 측정시험(DOC Die-away Test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내 부유물질 농도 : (mg/L)

5. 탄소 측정

- 사용된 탄소분석기 :

	플라스크 번호		n일 후의 DOC (mg/L)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질군	1	a ₁					
		a ₂					
		평균, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		평균, C _{b(t)}					
접종원 바탕시험군	3	c ₁					
		c ₂					
		평균, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		평균, C _{d(t)}					
	평균, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. 기초자료의 평가

플라스크 번호	결과 계산	n일 후의 분해도(%)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
평균*	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* D₁과 D₂ 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

7. 비생물 분해도(선택사항)

	기간 (일)	
	0	1
비생물 멸균 대조군의 DOC 농도(mg/L)	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S _b	
배양된 기초배양액	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

제2항 미생물분해시험(이분해성) : 이산화탄소 발생량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하는 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 발생하는 이산화탄소량을 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성 이어야 하며 시험물질 중 탄소 함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 이산화탄소량(ThCO_2 , Theoretical carbon dioxide)

시험물질이 완전하게 무기질화 될 때 생산될 수 있는 이론적으로 계산된 이산화탄소량. 이를 시험물질(mg) 당 발생된 이산화탄소량(mg)으로 표시

2.2 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.3 총유기탄소(TOC, Total organic carbon)

용액과 현탁액 속에 존재하는 유기탄소의 총량

2.4 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 이산화탄소량 또는 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThCO_2 ; 60 % 또는 DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L 사이의 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정용량의 기초배양액을 암조건에서 28 일간 이산화탄소가 없는 공기를 공급하며 배양한다. 이때 해당 시험물질의 미생물분해로 인해 생성된 이산화탄소를 측정하여 생분해도를 계산한다. 이산화탄소는 과량의 수산화바륨($\text{Ba}(\text{OH})_2$)이나 수산화나트륨(NaOH)으로 포집하고, 사용 후 남아 있는 수산화물을 적정하거나, 무기탄소를 측정하는 방법으로 측정한다. 생분해도(%)는 시험물질로부터 생성된 이산화탄소 양을 바탕시험군으로 보정한 이론적 이산화탄소량과의 비율로 표시한다. 또한 생분해도는 시험의 시작과 종료시 용존유기탄소 측정값을 이용하여 계산할 수도 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 바닥에 거의 닿는 포기관과 배출구가 설치되어 있는 2 L ~ 5 L 플라스크
- 2.1.2 자석 교반기(용해도가 낮은 화학 물질 적용시)
- 2.1.3 기체흡수 병
- 2.1.4 공기흐름 조절 및 측정 장치
- 2.1.5 이산화탄소 제거장치(20 % O_2 : 80 % N_2 비율의 혼합기체를 대신 이용할 수도 있다.)
- 2.1.6 이산화탄소를 측정하기 위한 장치(적정법 또는 무기탄소분석기)
- 2.1.7 pH 측정기
- 2.1.8 막 여과 장치(선택사항)
- 2.1.9 용존유기탄소 분석기(선택사항)

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

미생물분해시험 중 '용존유기탄소 감소량 측정시험(I)' (제4장 1항)의 기초배양액을 위한 원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.4 기초배양액 조제

미생물분해시험 중 '용존유기탄소 감소량 측정시험(I)' (제4장 1항)의 기초배양액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I) (제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다. 난용성 물질의 경우 (주 1)을 참고한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균대조군]

(*멸균제 대신 $0.2\ \mu m \sim 0.45\ \mu m$ 막 여과장치를 사용하여 멸균하는 것도 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성대조군]

2.7.1 접종원은 3.2항을 참고하여 플라스크 6을 제외한 모든 플라스크에 적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 7에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 5 L 플라스크에 2,400 mL 기초배양액 첨가
- 적당량의 접종원 첨가(3.2항 참고)
- 위의 혼합물에 하룻밤 동안 이산화탄소가 없는 공기 공급
- 최종 혼합물(3 L)내 시험물질의 농도가 용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L가 되도록 시험물질 원액 첨가
- 이산화탄소가 없는 공기를 미리 공급한 기초배양액을 넣어 최종 혼합물을 3 L로 맞춤

2.7.4 발생하는 이산화탄소를 포집하기 위한 포집병 준비

- 수산화바륨을 사용하는 경우, 0.0125 M 수산화바륨 100 mL 병 3 개를 5 L 플라스크에 연속해서 연결
- 수산화나트륨을 사용하는 경우, 0.05 M 수산화나트륨 200 mL 병 2 개를 5 L 플라스크에 연속해서 연결

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소 또는 총유기탄소로 10 mg/L ~ 20 mg/L

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid) 또는 ≤ 100 mL/L 2차 방류수

2.8.3 시험온도 : $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음과 같은 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성 상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 놓아두거나 1,100 ×g에서 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다. 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액으로 농축된 슬러지를 희석시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과하거나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2. 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 7 에 접종원을 적당량 넣는다. 이때 접종원 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 2.7항과 같은 방법으로 시험 플라스크를 준비한다.

3.3.2 이산화탄소가 포함되지 않은 공기를 30 mL/분 ~ 100 mL/분의 속도로 주입시킨다.

3.3.3 10 일 창 기간을 확인하기 위해 이산화탄소 분석은 처음 10 일간은 2 일이나 3 일에 한번 실시하고 그 후에는 28 일째 되는 날까지 적어도 5 일에 한번 분석한다.

3.3.4 수산화바륨을 이용하여 이산화탄소를 포집한 경우, 시험플라스크와 가장 가까운 수산화바륨 포집병의 흡수제를 분리하고 페놀프탈레인을 지시약으로 사용하여 0.05 M 염산으로 수산화물을 적정한다.

- 이산화탄소 분석을 위해 처음 제거한 흡수제 바로 다음 흡수제를 제거된 흡수제 자리로 이동 시키고 새롭게 조제한 흡수제를 시험 용기에 가장 먼 위치에 연결시킨다.

- 이와 같은 적정은 적어도 일주일에 한번 실시한다.

3.3.5 수산화나트륨을 흡수제로 사용한 경우, 주사기를 이용하여 시험 플라스크에 가장 가까운 흡수제로부터 수산화나트륨의 시료를 채취한다.

- 채취하는 시료의 양은 시험의 전 기간에 걸쳐 흡수제 양을 현저하게 변화시키지 않게 한다. 탄소 분석기로 채취한 시료의 이산화탄소양을 직접 분석한다.

- 이산화탄소가 두 번째 포집병까지 있을 경우의 보정을 위하여 시험 종료 시 두 번째 포집병의 이산화탄소양을 분석한다.

3.3.6 용존유기탄소나 특정 화학물질 분석이 필요할 경우 28 일째 되는 날 시료를 채취할 수도 있다.

- 1 mL의 진한 염산을 각 시험플라스크에 첨가하고 하루 동안 공기를 공급하여 이산화탄소를 빼낸다.

- 29 일차에 마지막으로 발생된 이산화탄소양 분석을 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는(주 4)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 수산화바륨(0.0125 M Ba(OH)₂)을 이용한 분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{생성된 CO}_2 \text{ 양 (mg) (주 2)}}{\text{ThCO}_2 \times \text{첨가된 시험물질 양 (mg)}} \times 100$$

ThCO₂ : 이론적 이산화탄소양

또는

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{생성된 CO}_2 \text{ 양 (mg) (주 2)}}{\text{시험에 첨가된 TOC (mg)} \times 3.67} \times 100$$

3.67 : 탄소에서 이산화탄소로 환산계수(44/12)

1.3 수산화나트륨(0.05 M NaOH)을 이용한 분해도(%) 산출 방법

$$\text{ThCO}_2(\%) = \frac{\text{시험물질군 IC(mg)} - \text{바탕시험군의 IC (mg)}}{\text{시험물질로 첨가된 TOC (mg)}} \times 100$$

IC (Inorganic carbon) : 무기탄소의 양

1.4 용존유기탄소 감소량 측정시험(제4장 1항)에 제시된 식을 이용하여 용존유기탄소 감소에 의한 분해도(%)를 산출한다.

1.5 비생물 분해도(%) 산출 방법

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{\text{28일 후 비생물 멸균대조군에서 생성된 CO}_2 \text{ (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 이론적 이산화탄소량에 대해 25 % 또는 용존유기탄소에 대해 35 % 미만이라면, 시험물질이

억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 3). 이러한 경우, 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 부유물질 30 mg/L 이하를 넘지 않는 더 높은 농도 수준의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험 한다.

2. 시험의 적합성

2.1 시험을 시작할 때 기초배양액 내 시험물질 현탁액의 무기탄소(IC) 함유량은 총유기탄소의 5 % 미만 이어야 하고, 시험종료 시 접종원 바탕시험군의 총 이산화탄소 발생은 40 mg/L(배양액)를 초과하면 안된다. 만약 70 mg CO₂/L 보다 큰 값을 얻었다면 데이터와 실험 방법에 대한 정밀한 조사가 필요하다.

2.2 정체기, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.3 표준물질의 이론적 이산화탄소량 발생에 의한 분해도 또는 용존유기탄소 감소에 의한 분해도가 14 일 내에 각각 60 % 또는 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간
- 3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물
 - (4) 분자량 및 물리화학적 성질

- 3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등
(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법
(4) 시험방법

- 3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료
(2) 생분해도(%)
(3) 관찰된 억제현상
(4) 미생물 분해도
(5) 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) 이산화탄소량 계산방법(수산화바륨 사용 시)

$$\frac{0.05 \times (50 - \text{적정된 염산 양(mL)}) \times 44}{2} = 1.1 \times (50 - \text{적정된 염산 양(mL)})$$

0.05 : 염산의 농도(M)

50 : 수산화바륨을 적정하기 위한 염산의 양

44 : 이산화탄소의 분자량

2 : 수산화바륨을 적정하기 위한 염산의 몰(mol)비

ex) 접종원의 이산화탄소 발생에 대해 적정에 사용된 염산량이 48 mL이고, (접종원 + 시험물질)의 이산화탄소 발생에 대해 염산이 45 mL 사용되었을 경우 접종원에 의해 발생된 이산화탄소 = $1.1 \times (50 - 48) = 2.2 \text{ mg}$ (접종원 + 시험물질)에 의해 발생된 이산화탄소 = $1.1 \times (50 - 45) = 5.5 \text{ mg}$ 이므로 시험물질로부터 생성된 이산화탄소의 양은 3.3 mg 이다.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 4) 이산화탄소 발생량 측정시험(CO₂ Evolution test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액 농도 : (mg/L)

- 배양액 초기농도: (mg/L)

- 플라스크에 첨가된 총 탄소 : (mg C)

- 이론적 이산화탄소량 : (mg CO₂)

4. 접종원

- 출처 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물 내 부유물질 농도 : (mg/L)

5. 이산화탄소 생성과 분해도

- 방법 : 수산화바륨/수산화나트륨/기타

시간 (일)	생성된 CO ₂ (mg)					생성된 누적 CO ₂ (mg)		% ThCO ₂ $\frac{\text{누적 CO}_2 \times 100}{\text{ThCO}_2}$		
	시험물질군		바탕시험군			시험 - 바탕시험 평균				
	플라스크 1	플라스크 2	플라스크 3	플라스크 4	평균	플라스크 1	플라스크 2	플라스크 1	플라스크 2	평균*
0										
n ₁										
n ₂										
n ₃										
n ₄										
28										

*

반복구간 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 탄소 분석(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시간(일)	시험물질군 (mg/L)	접종원 바탕시험군 (mg/L)
0	(C ₀)	(C _{bl(0)})
28(또는 배양종료)	(C _t)	(C _{bl(t)})

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

7. 비생물 분해도(선택사항)

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{\text{28일 후 비생물 멸균대조군 CO}_2 \text{ 생성 (mg)}}{\text{ThCO}_2 \text{ (mg)}} \times 100$$

제3항 미생물분해시험(이분해성) : MITI 수정시험 I

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 측정하기 위한 방법으로 반응기 내 산소흡수량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 난용성 물질의 경우 초음파 등을 이용하여 미세하게 분쇄하여 사용해야 하고, 용매나 유화제를 사용하지 않는다. 휘발성 물질의 경우 자동 호흡 측정기 내 사각지대(Dead gas space)의 부피가 최소가 되도록 한다. 또한 시험물질의 이론적 산소요구량 계산을 위해서 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시되기도 함

2.2 생물화학적 산소요구량(BOD, Biochemical oxygen demand)

시험물질이 미생물에 의하여 대사될 때 소비되는 산소량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.4 1차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화하는 것

2.5 최종 생분해(Ultimate biodegradation)

화학물질이 미생물 분해작용을 통해 완전히 분해되어 이산화탄소, 물, 무기염류 및 새로운 미생물 세포로 전환되는 것

II. 시험

1. 원리

기초배양액에 시험물질을 교반하거나 현탁액 상태로 처리하여 시험물질에 적응되지 않은 미생물 접종원을 넣은 후, $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인 암조건에서 밀폐식 호흡측정기를 이용하여 28 일간의 산소 흡수정도를 측정한다. 이때 발생한 이산화탄소는 소다석회에 의해 흡수되며, 생분해도는 이론적 산소요구량에 대한 대조군으로 보정한 산소흡수율로 나타낸다. 또한 배양을 시작하고 종료할 때 화학분석을 수행하여 1차 생분해도를 산출할 수도 있으며, 용존유기탄소 분석(주 1)을 통해 최종 생분해도를 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 이산화탄소 흡수제를 담을 수 있는 밀폐 가능한 300 mL 용량의 병 6 개로 구성된 자동 생물화학적 산소요구량 측정기 또는 호흡측정기
- 2.1.2 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온수조
- 2.1.3 용존산소 측정기
- 2.1.4 pH 측정기
- 2.1.5 액체크로마토그래피 등 시험물질 분석기기
- 2.1.6 탄소분석기(선택사항) 등

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액의 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·12수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	44.60 g
염화암모늄(NH_4Cl)	1.70 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous)	27.50 g
--------------------------------------	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D를 각 3 mL 씩 취하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험병의 준비

6 개의 시험병을 다음과 같이 준비한다.

시험병 1 : 물 + 시험물질(100 mg/L) [비생물적 대조군]

시험병 2, 3 및 4 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질(100 mg/L) [시험물질군]

시험병 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질(100 mg/L) [활성도 대조군(절차대조군)]

시험병 6 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

2.6.1 접종원은 3.2항을 참고하여 시험병 1 을 제외하고 소량씩 넣는다.

2.6.2 용해도가 낮은 시험물질은 무게 또는 부피기준으로 직접 첨가하며, 이때 용매나 유화제는 사용하지 않는다.

2.6.3 일정량의 이산화탄소 흡수제를 모든 시험병에 첨가하고 필요시 접종 전에 시험병 2, 3 및 4의 pH를 7로 조정한다.

2.7 시험조건

(1) 시험물질의 농도 : 100 mg/L

(2) 활성슬러지 농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, Suspended solid)

또는 약 10^7 cells/L ~ 10^8 cells/L

(3) 시험온도 : $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

(4) 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 채취

신선한 미생물 접종원 시료를 전국을 대상으로 하여 적어도 10 군데 이상의 장소에서 채취해야 하며, 주로 다양한 화학물질이 많이 사용되고 폐기되는 지역의 도시하수처리장, 산업폐수처리장, 강, 호수, 바다 등에서 채취한다.

3.1.2 채취횟수

연 4 회, 3 개월 간격(예; 3 월, 6 월, 9 월 및 12 월)으로 채취한다.

3.1.3 채취시료

- (1) 도시하수 및 산업폐수처리장 : 슬러지 1 L
- (2) 강, 호수, 바다 등 : 표층수 1 L, 공기와 접촉하는 물가의 표토 1 L

3.1.4 운반

채취한 접종원 시료를 용기에 넣고 공기를 공급하면서 운반한다.

3.1.5 접종원의 배양 및 슬러지의 활성화

여러 지역에서 채취해 온 접종원 시료들을 같은 용기에 섞고 부유물질을 제거한 후 놓아둔다. 상등액의 pH를 수산화나트륨 또는 인산을 이용하여 7 ± 1 로 조정한다. 후 여과한다.

여과된 상등액 적정량을 활성화슬러지 배양조에 옮겨 약 23.5 시간 동안 공기를 공급하고, 그 후 30 분간 공기 공급을 중단한 후 전체 부피의 1/3 에 해당하는 상등액을 제거하고 같은 양의 0.1 % 합성배지(주 2)를 넣은 후 다시 공기를 공급한다. 배양기간 동안 0.1 %의 합성배지는 1 일 1 회 공급하며 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH는 7 ± 1 를 유지한다.

3.1.6. 접종원의 관리

배양단계에서 관리는 다음의 항목을 점검하여 필요한 조치를 한다.

3.1.6.1 상등액의 정상 : 상등액은 투명하여야 한다.

3.1.6.2 침전성 : 슬러지의 침전성이 뛰어나야 한다.

3.1.6.3 생성상태 : 미생물군집이 증가하지 않는 경우에는 0.1 % 합성배지의 첨가량 또는 첨가회수를 증가시킨다.

3.1.6.4 pH : 상등액의 pH는 7 ± 1 을 유지한다.

3.1.6.5 온도 : 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다.

3.1.6.6 공기공급량 : 배양액 중 용존산소농도가 5 mg/L 이상이 되도록 한다.

3.1.6.7 생물상 : 현미경(100 배율 ~ 400 배율)으로 관찰했을 때 원생동물이 발견되어야 한다.

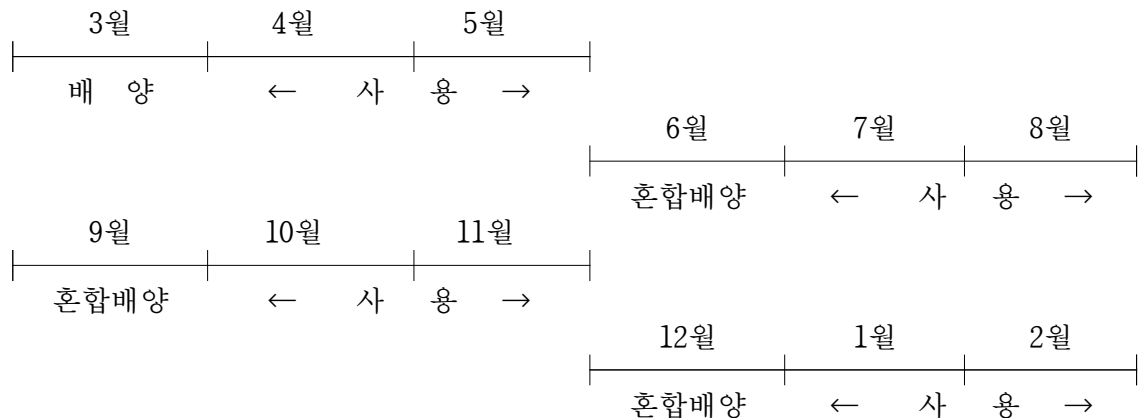
3.1.6.8 원생동물 측정 : 혈구판을 이용하여 대구획 ($1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 0.1\text{ mm}$) 여덟 구역에 있는 원생동물의 수를 모두 더하여 8 로 나눈 후 그 값에 $\times 10,000$ 을 하여 시료 1 mL당 들어 있는 원생동물을 계수한다.

3.1.6.9 생균수 측정 : 10^7 까지 단계적으로 희석한 적정 농도의 희석액을 45 °C 로 식힌 고체배지(Nutrient agar)에 주입하여 30 °C에서 48 시간 배양한 후 생균수를 측정하는 생균수 측정법(예, 평판배양법)으로 계수한다.

3.1.7 신·구접종원의 혼합

새로운 활성슬러지는 최소한 1 개월 배양할 때까지 접종원으로서 시험에 사용하지 않으며, 배양한지 4 개월 넘은 활성슬러지도 사용하지 않는다. 따라서 3 개월에 한번 씩 새로 접종원을 채취한다.

신·구접종원의 동일한 활성도를 유지하기 위하여 현재 시험에 사용하고 있는 활성슬러지 상등액을 여과한 여액과 새로 채취한 접종원 혼합물의 여과한 상등액을 같은 양씩 혼합하여 배양한다. 이때 접종원은 합성배지를 가한 후 18 시간 ~ 24 시간 이상 경과한 활성슬러지를 사용한다. 접종원의 준비 및 사용에 관한 예는 다음과 같다.



< 접종원의 사용기간 >

3.1.8. 접종원 활성도 점검

표준물질을 사용하여 적어도 3 개월마다 1 회씩 정기적으로 접종원으로 사용되는 활성슬러지의 활성도를 점검한다. 특히 신·구접종원을 혼합할 때는 접종원의 활성도 점검이 필요하다.

3.2 접종

미생물 접종원으로 배양된 활성슬러지를 준비된 시험병 2 ~ 6 에 소량씩 넣는다. 이때 접종물의 농도는 각각 부유물질로서 30 mg/L가 되도록 한다.(세포수로 약 10^7 cells/L ~ 10^8 cells/L). 시험병 1 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것이므로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 생분해도 시험장치를 조립한 후 시험장치가 밀폐되었는지 확인한 후 교반기를 돌리기 시작하며, 암조건에서 산소흡수도를 측정하기 시작한다. 항온기를 이용하여 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 충분히 교반하면서 28 일간 배양한다.

3.3.2 하루에 1 회 산소흡수도, 온도, 교반기 작동정도, 시험병 내용물의 색변화 등을 확인한다. 시험종료 후 시험병 내 시험용액의 pH, 시험물질의 잔류량 및 가능한 경우 중간생성물 농도 등을 확인한다. 시험물질의 잔류량 측정은 시험물질에 적당한 용제로 추출 및 농축하고 적절한 분석기기를 이용하여 정량분석한다.

3.3.3 시험물질이 수용성인 경우 용존유기탄소를 이용하여 분해도를 산출할 수 있으며, 질소를 포함하는 물질인 경우 가능하다면 질산화에 소모된 산소량을 고려한다(NO_2^- , NO_3^- 농도 측정)(주 1).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 4)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 생물화학적 산소요구량 측정에 의한 생분해도(%) 산출

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD}_{\text{sample}} - \text{BOD}_{\text{blank}}}{\text{ThOD}} \times 100$$

$\text{BOD}_{\text{sample}}$: 시료의 시험물질(또는 표준물질)의 BOD 측정값(mg)

$\text{BOD}_{\text{blank}}$: 접종원 바탕시험군의 BOD 측정값(mg)

ThOD : 이론적 산소요구량 계산 값(mg)(주 1)

ThOD는 질산화 여부를 고려하여 계산할 수 있다(주 1, 주 3).

1.3 화학분석에 의한 분해도(%) 산출

$$\text{분해도(\%)} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

S_a : 시험종료시 시험물질의 잔류량 측정값(mg/L)

S_b : 비생물적 대조군의 시험물질 잔류량 측정값(mg/L)

1.4 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 (%) 산출(선택사항)

$$\text{분해도(\%)} = \frac{a - (b - c)}{a} \times 100$$

a : 비생물적 대조군의 DOC 측정값(mg/L)

b : 시험물질군의 DOC 측정값(mg/L)

c : 접종원 바탕시험군의 DOC 측정값(mg/L)

2. 시험결과의 적합성

2.1 시험병 6 (접종원 바탕시험군)의 산소흡수량은 일반적으로 20 mg O₂/L ~ 30 mg O₂/L이며, 28 일째에 60 mg O₂/L을 넘어서는 안된다.

2.2 pH 값이 6.0 ~ 8.5 범위를 벗어난 상태로 시험물질의 산소소모 정도가 60 % 미만이면 시험물질을 저농도로 하여 재시험한다.

2.3 시험 종료 시 반복구간 시험물질 분해도의 차이가 20 % 미만이어야 한다.

- 2.4 산소소비량으로부터 구한 표준물질(아닐린) 생분해도가 7 일 후에 40 % 또는 14 일 후에 65 %가 넘지 않는 경우, 접종원의 활성도에 문제가 있으므로 이 시험은 부적합한 것으로 간주하고 다시 수행한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간
- 3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물
 - (4) 분자량 및 물리화학적 성질
- 3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
 - (2) 접종원 : 채취장소, 전처리방법 및 농도 등
 - (3) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)
- 3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료
 - (2) 생물화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)
 - (3) 관찰된 억제현상
 - (4) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도
 - (5) 시험물질의 크로마토그램 또는 스펙트럼
 - (6) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도
- 3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) 0.1 % 합성배지 : 포도당, 펩톤 및 인산칼륨 각각 1 g을 물 1 L에 녹이고 수산화나트륨을 이용하여 pH를 7.0 ± 1.0 으로 조절.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) MITI 수정시험 I 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험초기농도 : (mg/L)

- 이론적 산소요구량 : (mg O₂/L)

4. 접종원 :

- 접종원 채취 지역

1) 6)

2) 7)

3) 8)

4) 9)

5) 10)

- 합성배지로 배양된 활성슬러지 부유물질(SS) 농도 : (mg/L)

- 최종 시험액 L당 첨가한 활성슬러지 부피 : (ml)

- 최종 시험액의 활성슬러지 농도 : (mg/L)

5. 생분해도

- 사용된 호흡측정기기 :

	시간(일)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질 처리군 BOD값				
시험병 2				
시험병 3				
시험병 4				
접종원 바탕시험군 BOD값				
생분해도(%): (BOD-B)/ThOD × 100				
시험병 2				
시험병 3				
시험병 4				
평균값*				

* 반복구간 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

6. 용존유기탄소 분석에 의한 분해도(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시험병	DOC				DOC 감소율(%)	평균
	측정값		보정값			
시험병 1	a				-	-
시험병 2	b1		b1-c			
시험병 3	b2		b2-c			
시험병 4	b3		b3-c			
시험병 6	c		-		-	-

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \frac{a - (b-c)}{a} \times 100$$

7. 화학분석에 의한 분해도

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
시험병 1	Sb	
시험병 2	Sa1	
시험병 3	Sa2	
시험병 4	Sa3	

$$\text{분해도}(\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

8. 시간 경과에 따른 생물화학적 산소요구량(BOD) 곡선

제4항 미생물분해시험(이분해성): 밀폐시험병을 이용한 용존산소 소모량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 소모되는 용존산소량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 이 방법은 이론적 산소요구량을 계산할 수 있도록 시험물질의 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이론적 산소요구량을 계산할 수 없다면 화학적 산소요구량도 사용 가능하나 불완전한 산화가 일어나면 오차가 커질 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며, 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 화학적 산소요구량(COD, Chemical oxygen demand)

고온의 산성 조건에서 중크롬산칼륨으로 시험물질을 산화시키는 동안 소모되는 산소의 양. COD는 물질 중에 산화될 수 있는 물질의 양에 대한 척도이며, 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 산소요구량 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThOD; 60 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성 물질이라 할 수 없음. 다만, 본 시험에서 10 일 창을 적용할 때 시험병이 과도하게 많이 필요한 경우, 14 일 창을 대신 적용할 수 있음.

II. 시험

1. 원리

시험물질(2 mg/L ~ 5 mg/L)을 함유하고 있는 기초배양액에 소량의 접종원을 첨가하고 시험병에 넣어 완전히 밀폐시킨 후, $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 인 암조건에서 28일간 배양한다. 생분해도는 배양기간 중 용존산소요구량에 대한 이론적 산소요구량 또는 화학적 산소요구량의 비율로 나타낸다. 생분해과정 중 미생물에 의해 흡수된 산소량은 접종원 바탕시험군으로 보정하여 계산해야 한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 250 mL ~ 300 mL 또는 100 mL ~ 125 mL 용량의 유리 마개가 있는 생물 화학적 산소요구량 시험병(BOD병)

2.1.2 암조건에서 일정한 온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온 수조

2.1.3 기초배양액 조제용 유리병(2 L ~ 5 L)

2.1.4 산소 전극과 측정기 또는 윙클러 적정(Winkler titration)을 위한 장비와 시약

2.1.5 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2) 27.50 g

또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌다이아민사아세트산나트륨(EDTA Disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다.

기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D 각 1 mL 씩 취하여 800 mL 물에 섞은 후 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질 표준원액

물질의 용해도가 1 g/L를 초과하는 경우 시험물질이나 표준물질 1 g ~ 10 g을 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다. 또는 기초배양액에 직접 시험물질이나 표준물질을 첨가하고 완전히 용해되도록 조제한다(주 1).

2.7 시험병의 준비

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험물질군]

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

시험병 최소 10 개 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

시험병 6 개 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 적어도 20 분간 기초배양액에 다량의 공기를 공급한 후 시험 온도에서 20 시간 동안 공기공급 없이 놓아두었다가 용존산소 농도를 측정한다. 20 °C에서 용존산소 농도는 약 9 mg/L가 되어야 한다. 각 시험병에 기초배양액을 채울 때 기포가 생기지 않도록 해야 하며, 배양액 중 공기는 포화상태여야 한다.

2.7.2 시험기간 동안 최소한 두 번의 산소 소모량을 측정하도록 위와 같이 충분한 수의 시험병이 필요하며, 10 일 창을 확인하기 위해서는 2 배 정도의 시험병이 더 필요할 수 있다.

2.7.3 준비된 기초배양액을 큰 유리병에 1/3 정도 넣고 해당되는 유리병에는 시험물질의 최종농도가 10 mg/L가 초과하지 않도록 넣는다.

2.7.4 적용 가능한 시험물질의 가장 높은 농도는 시험물질의 이론적 산소요구량으로 계산할 수 있다.

- 분해도가 낮거나 이론적 산소요구량이 낮은 화학물질의 경우 5 mg/L ~ 10 mg/L 농도를 사용할 수 있다.

- 때에 따라 서로 다른 두 농도에서 병행시험을 수행할 수 있다

(예 : 2 mg/L 및 5 mg/L).

- 일반적으로 암모늄염 생성에 기초하여 이론적 산소요구량을 계산한다. 만약 질산화가 예상되거나 발생한다고 알려져 있다면, 질산염 생성에 기초하여 $\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$ 를 계산한다(주 2).

2.7.5 접종원(0.05 mL/L ~ 5 mL/L)을 넣고 공기가 공급된 기초배양액으로 용액의 용량을 맞춘다. 이때 적절히 섞일 수 있도록 유리병의 바닥에 닿는 호스를 이용(사이펀)하여 기초배양액을 첨가한다.

2.8 시험조건

- 2.8.1 시험물질의 농도 : 10 mg/L 이하
- 2.8.2 접종원 농도 : 0.05 mL/L ~ 5 mL/L
- 2.8.3 시험온도 : 22 °C ± 2 °C
- 2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2
- 2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

일반적으로 생활하수처리 시설이나 연구실 단위의 2 차 방류수를 이용하며, 다른 방법으로는 지표수를 채취하여 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(Aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 그냥 놓아두거나 1,100 ×g에서 10 분 동안 원심분리한 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다.

- 농축된 활성슬러지에 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액을 첨가하고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

접종원을 준비된 시험병에 적당량(0.05 mL/L ~ 5 mL/L) 넣는다. 접종원의 최적의 양을 결정하기 위해 예비시험을 수행할 수 있다.

3.3 분해도 시험

3.3.1 앞에서 조제한 큰 유리병의 하부 1/4 지점에서 호스(사이펀 등)로 각각 조제된 용액이나 현탁액을 즉시 시험병의 개별 그룹에 분주하여 채워준다. 용해도가 낮은 물질 첨가시에는 큰 유리병을 계속 교반하면서 시험병을 채운다. 이때 기포를 제거하기 위해 부드럽게 두드려 준다.

3.3.2 잉클러(Winkler)법이나 전극법으로 0 시간 시료의 용존산소를 측정한다.

- 잉클러법에서 즉시 분석이 어려울 경우 첫 단계의 잉클러시약인 황산망간(II)(MnSO_4)과 수산화나트륨(NaOH)을 첨가하여 밀폐시킨 시험병을 다음 단계 24 시간 전까지 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건 하에서 보관한다.

- 나머지 반복구 시험병들도 공기방울이 생기지 않도록 밀폐한 후 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건에서 보관한다.

3.3.3 28 일 배양 기간 중 적어도 일주일에 한 번 정도의 간격으로 각 처리군별 최소 두 개의 시험병에서 용존산소 분석을 위한 시료를 채취한다. 이 시료로는 14 일 창감소비율을 평가해야 하고 이와는 별도로 매 3 일 ~ 4 일마다 채취하는 시료는 10

일 창을 확인할 수 있어야 한다. 이러한 경우 약 2 배 정도의 시료 병이 필요할 수 있다.

3.3.4 일반적으로 생분해도는 이론적 산소요구량을 계산하여 구한다. 질소 함유 물질에 대해서는 질산화에 의한 산소섭취 보정이 필요하다. 질산화의 유무에 따라 질산화에 의한 이론적 산소요구량($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$, $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$)를 적용하여 계산한다. 만약 질산화가 완전히 일어나지 않았다면 28 일 동안 아질산염과 질산염의 농도변화로 부터 소비된 산소량을 계산하여 보정한다(주 2)(주 3).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 6)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 이론적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})}{\text{ThOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})} \times 100$$

BOD : 시료의 생물화학적 산소요구량 mg(주 4)

ThOD : 이론적 산소요구량 mg(주 2)

1.3 화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})}{\text{COD}(\text{mg O}_2/\text{mg 시험물질})} \times 100$$

COD : 시료의 화학적 산소요구량 mg(주 2)

1.4 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 ThOD에 대해 25 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 5). 이러한 경우 낮은 농도에서 시험하거나, 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험한다.

2. 시험결과의 적합성

- 2.1 28 일 후 접종원 바탕시험군의 산소소모는 1.5 mg 용존산소/L를 초과하면 안 된다.
- 2.2 시험기간 중 시험병 내의 잔류 산소의 농도는 0.5 mg/L 미만으로 내려가면 안 된다.
- 2.2 정체기, 시험 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에는 각 시험병 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.
- 2.3 표준물질의 이론적 산소요구량에 근거한 분해도는 14 일 내에 60 %까지 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간
- 3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
 - (2) 입수처, 입수일
 - (3) 순도(%), 불순물
 - (4) 분자량 및 물리화학적 성질
- 3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
 - (2) 접종원: 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등
 - (3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법
 - (4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법
- 3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료
 - (2) 생분해도(%)
 - (3) 관찰된 억제현상
 - (4) 분해도 곡선
- 3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 3) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) 생물화학적 산소요구량 산출 방법

$$\text{BOD} = \frac{\text{시험물질 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)} - \text{접종원 바탕시험군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)}}{\text{mg 시험물질/L 시험병 용액}}$$
$$= \text{mg O}_2\text{/mg 시험물질}$$

주 5) OECD (1992). Test guideline 301. Ready biodegradability. Annex II.

주 6) 밀폐시험병을 이용한 용존산소 소모량 측정시험(Closed bottle test) 결과 작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

- 이론적 산소요구량 또는

화학적 산소요구량 : (mg O₂/mg 시험물질)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 용존산소 측정

- 측정방법 : 윙클러법/전극법

	시험병 번호		n일 후의 mg O ₂ /L			
			0	n ₁	n ₂	n _x
접종원 바탕시험군	1	c ₁				
	2	c ₂				
	평균	m _b = (C ₁ + C ₂)/2				
시험물질군	1	a ₁				
	2	a ₂				

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 질산화 보정

	배양시간(일)				
	0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
(i) 질산염 농도(mg N/L)					
(ii) 질산염 농도변화(mg N/L)	-				
(iii) 산소 등량(equivalent)(mg/L)	-				
(iv) 아질산염 농도(mg N/L)					
(v) 아질산염 농도변화(mg N/L)	-				
(vi) 산소 등량(mg/L)	-				
(iii+vi) 총 산소 등량	-				

7. 용존산소 소모량 : 분해도(%)

	n일 후의 DO 감소(mg/L)			
	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
$(m_b - a_1)^{(1)}$				
$(m_b - a_2)^{(1)}$				
$\% Da_1 = \frac{(m_b - a_1)^{(1)}}{\text{시험물질(mg/L)} \times \text{ThOD}} \times 100$				
$\% Da_2 = \frac{(m_b - a_2)^{(1)}}{\text{시험물질(mg/L)} \times \text{ThOD}} \times 100$				
$\% D_{\text{평균}} = \frac{Da_1 + Da_2}{2}$				

⁽¹⁾ $m_{b(0)} = a_{1(0)} = a_{2(0)}$ 인 경우,

$m_{b(0)}$ = 0일째에 바탕대조군의 값

$a_{1(0)}$ = 시험병 1에서 0일째 시험물질군의 값

$a_{2(0)}$ = 시험병 2에서 0일째 시험물질군의 값

$m_{b(0)}$ 이 $a_{1(0)}$ 또는 $a_{2(0)}$ 와 같지 않은 경우,

$(a_{1(0)} - a_{1(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ 및 $(a_{2(0)} - a_{2(x)}) - (m_{b(0)} - m_{b(x)})$ 를 이용하며

$m_{b(x)}$ = x일째에 바탕대조군의 평균값

$a_{1(x)}$ = 시험병 1에서 x일째 시험물질군의 값

$a_{2(x)}$ = 시험병 2에서 x일째 시험물질군의 값

8. 바탕대조군의 용존산소 소모량

바탕대조군에서 산소소모량[$(m_{b(0)} - m_{b(28)})$ mg/L]은 1.5 mg/L 미만이어야 한다.

상기 5항의 (iii + vi)로부터 질산화 보정을 적용한다.

제5항 미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(Ⅱ)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해되기 전후 용존유기탄소량의 차이를 측정하기 위함이다. 시험물질은 비휘발성이고 물에 대한 용해도가 100 mg/L이어야 하며 시험물질의 탄소함량 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이 시험법은 “미생물분해시험(이분해성) : 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)” (제4장 제1항) 방법과 유사하지만 더 낮은 농도의 미생물을 사용한다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 4,000 $\times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 1차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화하는 것

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

II. 시험

1. 원리

용존유기탄소 10 mg/L ~ 40 mg/L 사이에서 농도가 확인된 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 접종원(0.5 mL/L)을 넣고 22 °C ± 2 °C의 암조건에서 28 일간 공기를 공급하면서 배양한다. 시험기간 중 일정 시간 간격으로 용존유기탄소 분석을 실시하여 생분해도를 계산한다. 생분해도는 초기 용존유기탄소 농도에 대한 접종원 바탕시험군으로 보정한 감소율로 나타낸다. 또한 1차 생분해도는 배양의 시작과 끝에 모화합물에 대한 화학분석으로 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 용존유기탄소 분석에 필요한 용량에 따라 250 mL ~ 2,000 mL 의 삼각 플라스크를 사용한다. 플라스크는 각 시험 전에 알코올성 염산 등으로 철저히 세척하고 건조시켜야 한다.

2.1.2 진탕기

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

2.1.5 용존산소 측정장비

2.1.6 원심분리기

2.1.7 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

무수염화칼슘(CaCl_2)	27.50 g
또는 염화칼슘·2수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	0.25 g
--	--------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

사용 직전 용액조제의 번거로움을 피하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌디아민사아세트산나트륨염(EDTA disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다. 기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액 원액 A를 10 mL 취하여 800 mL 물에 섞은 후 원액 B, C, D를 각 1 mL씩 첨가하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

본 시험법에서는 접종원을 단지 0.5 mL/L만 사용하기 때문에 기초배양액에 미량 원소와 성장인자를 보강해야 한다. 최종 기초배양액 1 L에 미량원소 용액(i)과 비타민 용액(ii)을 각각 1 mL씩 넣어준다.

i) 미량원소 용액

황산망간·4수화물($\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	39.9 mg
붕산(H_3BO_3)	57.2 mg
황산아연·7수화물($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	42.8 mg
칠몰리브덴산육암모늄($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$)	34.7 mg
Fe-킬레이트($\text{FeCl}_3\text{-EDTA}$)	100.0 mg

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

ii) 비타민 용액

효모 추출액	15.0 mg
--------	---------

- 효모 추출액을 물 100 mL에 용해시키고 0.2 μm 막여과를 통해 멸균한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$), 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질의 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 0.2 μm ~ 0.45 μm 막 여과장치를 사용한 멸균 가능)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 멸균제 + 시험물질 [흡착 대조군]

플라스크 8 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 접종원은 3.2 항을 참고하여 플라스크 6 을 제외한 모든 플라스크에 적당량 넣는다.

2.7.2 플라스크 8에는 동일한 농도의 시험물질과 표준물질을 첨가한다.

2.7.3 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4로 조정한다.

2.7.4 플라스크 준비의 예(시험물질군)

- 2 L 플라스크에 800 mL 기초배양액 첨가
- 최종 혼합물 내 시험물질(또는 표준물질)의 농도가 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L가 되도록 시험물질(또는 표준물질) 표준원액 첨가
- 배양액 1 L당 0.5 mL의 접종원 첨가
- 플라스크 내 용액이 최종적으로 1 L가 되도록 기초배양액으로 채운다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소로 10 mg/L ~ 40 mg/L

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : 0.5 mL/L(기초배양액)

2.8.3 시험온도 : $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 접종원으로는 생활하수를 처리하는 시설이나 연구실 규모 단위장치의 2차 방류수에서 유래된 것을 이용한다. 채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.2 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시 까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 기초배양액 1 L 당 여과한 접종원 0.5 mL을 사용한다.

3.1.3 시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 8에 기초배양액 1 L 당 접종원을 0.5 mL 씩 접종한다. 플라스크 6은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 시험에 필요한 설치를 모두 마치고 진탕기에 넣기 전에 초기 용존유기탄소 농도 측정을 위해 각 플라스크에서 시료를 두 번씩 채취한다(주 1).

3.3.2 시료 채취를 마친 플라스크는 알루미늄 호일로 입구를 막고 진탕기에 넣어주며, 이때 암실에서 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 온도 하에 공기를 공급한다.

3.3.3 시험기간 동안 정해진 시간 간격으로 각 플라스크로부터 두 번씩 시료의 용존유기탄소 농도를 측정한다. 플라스크 1, 2(시험물질군)와 플라스크 3, 4(접종원 바탕시험군)의 용존유기탄소 농도를 동시에 측정해야 한다.

3.3.4 채취한 시료는 막여과장치로 여과한 후 초기의 20 mL 여과액은 버리고, 나머지 여과액을 10 % 이하의 탄소 농도를 정확하게 측정할 수 있는 용존유기탄소 분석기로 분석한다. 여과하거나 원심분리한 시료는 같은 날 분석하거나 일정기간 보관 후 분석한다.

3.3.5 10 일 창에서 용존유기탄소 감소비율을 확인할 수 있도록 충분한 수의 시료를 채취한다. 시료 채취 후 바로 분석을 수행하는 경우 분석 결과에 따라 다음 시료 채취 시간을 결정한다.

3.3.6 시료 채취 후 바로 분석을 하지 않고 보관하는 경우 시료채취는 매일 혹은 이틀에 한번 씩 채취한다. 시료의 보관은 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 조건에서는 최대 48 시간 이내에 분석해야 하고 장기간 보관해야 하는 경우에는 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이하로 보관한다.

3.3.7 시료를 채취할 때 플라스크로부터 최소량을 채취하고 용존유기탄소 농도를 측정한다. 실험과정 중의 증발 손실을 보충하기 위해 시료 채취 전에 필요량 만큼의 물을 첨가해 주고, 플라스크 벽면에 붙은 물질이 재용해 또는 재부유 되도록 잘 섞어준다.

3.3.8 시험 종료 후 분석을 실시할 때, 생분해 곡선을 그리기 위한 측정값이 상대적으로 적으면 마지막 시료부터 분석한다. 만약 마지막 시료에서 생분해가 일어나지 않았다면 더 이상 분석하지 않아도 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는(주 3)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

모든 농도는 실험으로 측정한 값이다.

1.3 비생물 분해도(%) 산출법

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

$C_{s(0)}$: 0일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

$C_{s(t)}$: t일에서 비생물 멸균 대조군의 DOC 농도

1.4 시험이 적합성 기준을 만족시켰다면 플라스크 1, 2의 평균을 이용하여 분해과정을 도표로 나타내고, 10일 창를 표시한다. 정체기, 시험종료 또는 '10일 창' 마지막에서의 용존유기탄소 감소율을 기록한다.

1.5 시험물질의 화학분석자료가 있는 경우 1 차 생분해도를 기록한다.

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 총 용존유기탄소 분해율이 14 일내에 35 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 2). 이러한 경우 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않을 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 더 높은 농도의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험한다.

2. 시험결과의 적합성

2.1 정체기, 시험 종료 또는 10 일 창 마지막 날에는 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.2 표준물질의 용존유기탄소 분해율은 14 일 내에 70 %까지 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

- 3.6 시험결과 :
- (1) 도표로 산출된 형태의 자료
 - (2) 생분해도(%)
 - (3) 관찰된 억제현상
 - (4) 미생물 분해도
 - (5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도
 - (6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)
 - (7) 용존유기탄소 감소에 의한 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 2) OECD (1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 3) 용존유기탄소 감소량 측정시험(Ⅱ)(Modified OECD Screening Test) 결과작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도 : (mg/L)

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물 내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 탄소 분석

- 사용된 탄소분석기 :

	플라스크 번호		n일 후의 DOC (mg/L)				
			0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
시험물질군	1	a ₁					
		a ₂					
		평균, C _{a(t)}					
	2	b ₁					
		b ₂					
		평균, C _{b(t)}					
접종원 바탕시험군	3	c ₁					
		c ₂					
		평균, C _{c(t)}					
	4	d ₁					
		d ₂					
		평균, C _{d(t)}					
	평균, C _{bl(t)} = $\frac{C_{c(t)} - C_{d(t)}}{2}$						

6. 기초자료의 평가

플라스크 번호	결과 계산	n일 후의 분해도(%)				
		0	n ₁	n ₂	n ₃	n _x
1	$D_1 = \left[1 - \frac{C_{a(t)} - C_{bl(t)}}{C_{a(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
2	$D_2 = \left[1 - \frac{C_{b(t)} - C_{bl(t)}}{C_{b(0)} - C_{bl(0)}} \right] \times 100$	0				
평균*	$D_t = \frac{D_1 + D_2}{2}$	0				

* D₁ 과 D₂ 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주 : 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

7. 비생물 분해도(선택사항)

	기간 (일)	
	0	1
비생물 멸균 대조군의 DOC 농도(mg/L)	C _{s(0)}	C _{s(t)}

$$\text{비생물 분해도(\%)} = \frac{C_{s(0)} - C_{s(t)}}{C_{s(0)}} \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S _b	
배양된 기초배양액	S _a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

제6항 미생물분해시험(이분해성) : 압력계를 이용한 산소 소모량 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 호기조건의 물 속에서 미생물에 의하여 잘 분해될 가능성이 있는지 확인하기 위한 방법으로, 압력계를 이용하여 시험물질이 미생물에 의해 분해될 때 소모되는 산소량을 측정하기 위함이다. 시험물질에 대한 취급방법 등 유의사항이 확인된 경우 휘발성 물질이나 난용성 물질도 평가할 수 있다. 이 방법은 이론적산소요구량을 계산할 수 있도록 시험물질의 분자식 및 순도 등의 특성을 알아야 한다. 이론적 산소요구량을 계산할 수 없다면 화학적 산소요구량도 사용 가능하나 불완전한 산화가 일어나면 오차가 커질 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 이론적 산소요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 필요한 산소의 총량. 이 값은 분자식으로부터 계산되며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 화학적 산소요구량(COD, Chemical oxygen demand)

고온의 산성조건에서 중크롬산칼륨으로 시험 물질을 산화시키는 동안 소비되는 산소의 양. COD는 물질 중에 산화될 수 있는 물질의 양에 대한 척도를 나타내며 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.3 10 일 창(10-day window)

‘10 일 창’이란 대상물질이 미생물에 의해 10 % 생분해도가 달성된 직후부터 10 일 동안의 기간. 이론적 산소요구량 또는 용존유기탄소 기준으로 생분해도가 10 %에 도달했을 때 ‘10 일 창’이 시작되며 이때로부터 10 일 이내에 이분해성 기준을 만족하는 생분해도(ThOD; 60 % 또는 DOC; 70 %)에 이르러야 함. 이 모든 과정은 28 일 이내에 이루어져야 하며, 28 일이 지난 후 ‘10 일 창’을 만족하는 경우 해당 시험대상물질은 이분해성물질이라 할 수 없음

2.4 최종 생분해(Ultimate biodegradation)

화학물질이 미생물 분해작용을 통해 완전히 분해되어 이산화탄소, 물, 무기염류 및 새로운 미생물세포로 전환되는 것

II. 시험

1. 원리

알려진 농도(이론적 산소요구량으로 50 mg/L ~ 100 mg/L 범위의 시험물질 약 100 mg/L)의 시험물질을 함유하고 있는 일정 용량의 기초배양액에 접종원을 첨가시키고 플라스크에 넣어 밀폐시킨 후, 일정온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)로 28 일간 교반한다. 산소 소모량은 호흡측정기 플라스크의 일정 기체용적을 유지시키는 데 필요한 산소량(전기적 생성)을 측정하거나 측정장치의 부피 및 압력 변화로 측정한다. 시험 중 생성된 이산화탄소는 수산화칼륨이나 다른 흡착제를 사용하여 포집한다. 생분해도는 생분해과정 중 미생물에 의해 사용된 산소량을 접종원 바탕시험군으로 보정하여 계산하며, 이론적 산소요구량이나 화학적 산소요구량에 대한 비율로 나타낸다. 또한 선택사항으로 1차 생분해도는 배양의 시작과 종료 시에 모화합물에 대한 화학분석으로 계산할 수 있으며, 최종생분해는 용존유기탄소 분석에 의해 계산할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 호흡량 측정기(Respirometer)
- 2.1.2 일정한 온도($\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)를 유지 할 수 있는 온도 조절기
- 2.1.3 막여과장치(선택사항)
- 2.1.4 탄소분석기(선택사항)
- 2.1.5 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 기초배양액을 위한 원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.4 기초배양액 조제

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 기초배양액 조제와 동일한 방법으로 조제한다.

2.5 표준물질

시험의 정상적 수행여부를 확인하기 위하여 시험에 표준물질을 포함시켜 수행한다. 표준물질로는 아닐린(C_6H_5N), 아세트산나트륨($C_2H_3NaO_2$), 벤조산나트륨($C_7H_5NaO_2$) 등을 사용한다.

2.6 시험물질의 표준원액

미생물분해시험 중 용존유기탄소 감소량 측정시험(I)(제4장 1항)의 시험물질 표준원액 조제와 동일한 방법으로 조제한다. 난용성 물질의 경우(주 1)을 참고한다.

2.7 시험 플라스크의 준비

플라스크 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

플라스크 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

플라스크 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

플라스크 6 : 기초배양액 + 멸균제 + 시험물질 [비생물 멸균 대조군]

(*멸균제 대신 $0.2\ \mu m \sim 0.45\ \mu m$ 막 여과장치를 사용하여 멸균 가능)

(*비생물 멸균 대조군의 경우 일반적으로 시험물질은 이론적 산소요구량 $100\ mg/L$ 로 하여 멸균 후 첨가)

플라스크 7 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 + 표준물질 [독성 대조군]

2.7.1 질산화가 예상되지 않는 경우 암모늄염 생성에 기초하여 이론적 산소요구량을 계산한다. 만약 질산화가 예상되거나 발생한다고 알려져 있다면 질산염 생성에

기초하여 $\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$ 를 계산한다(주 2).

2.7.2 필요시 접종 전에 모든 플라스크의 pH를 7.4 ± 0.2 로 조정한다.

2.7.3 수산화칼륨, 소다석회 알갱이 또는 다른 흡수제를 이산화탄소 흡수 용기에 첨가한다.

2.8 시험조건

2.8.1 시험물질의 농도 : 100 mg/L (이론적 산소요구량 50 mg/L ~ 100 mg/L)

2.8.2 접종원(활성슬러지)농도 : ≤ 30 mg/L 부유물질(SS, suspended solid) 또는 ≤ 100 mL/L 2차 방류수

2.8.3 시험온도 : $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

2.8.4 pH : 7.4 ± 0.2

2.8.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1. 접종원 채취

활성슬러지, 하수 방류수, 지표수, 토양 또는 이들의 혼합물 등을 사용한다.

3.1.2. 채취횟수

규정된 채취횟수는 없다.

3.1.3. 채취시료

접종원 시료의 채취는 다음의 3 개의 방법 중 1 개를 선택하여 사용한다.

3.1.3.1 활성슬러지 : 생활하수를 처리하는 하수처리 시설이나 연구실 단위의 포기조(aeration tank)에서 채취한다. 굵은 입자는 체로 걸러서 사용하며, 이후 호기성상태로 유지한다.

- 다른 방법으로는 채취해 온 시료를 촘촘한 체로 여과하여 굵은 입자를 제거하고 놓아두거나 $1,100 \times g$ 에서 10 분 동안 원심분리 후, 상등액을 제거하고 필요에 따라 슬러지를 기초배양액으로 세척한다. 1 L당 3 g ~ 5 g의 부유물질 농도가 되도록 기초배양액으로 농축된 슬러지를 부유시키고 필요시까지 공기를 공급한다.

3.1.3.2 생활하수 처리시설이나 연구실 단위 장치의 2차 방류수

- 시료 채취 후 1 시간 정도 놓아두거나 거친 여과지로 여과시킨다. 필요시까지 처리한 방류수나 여과액을 호기성 상태로 유지한다. 이 형태의 접종원은 배양액 1 L 당 100 mL까지 사용할 수 있다.

3.1.3.3 지표수

- 강, 호수 등의 적절한 지표수를 채취하여 필요시까지 호기성 상태로 유지한다. 필요한 경우 여과나 원심분리하여 접종원을 농축한다.

3.1.4. 운반

채취한 접종원 시료들을 용기에 넣고 호기성 상태를 유지(공기 공급)하면서 운반한다.

3.1.5. 접종원의 관리(사전조정)

시험 시작 전 5 일 ~ 7 일 동안 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도에서 시험물질이 들어 있지 않은 기초배양액에 활성슬러지나 2 차 방류수를 넣고 공기를 공급한다.

3.2. 접종

준비된 플라스크 중 6을 제외한 1 ~ 7 에 접종원을 소량씩 넣는다. 이때 접종원의 농도는 각각 부유물질로 30 mg/L를 넘지 않도록 한다. 플라스크 6 은 비생물적 요인에 의한 분해도를 알기 위한 것으로 접종하지 않는다.

3.3. 분해도시험

3.3.1 시험온도로 맞춰진 상태에서 생분해도 시험장치를 조립한 후 시험장치가 밀폐되었는지 확인한 후 교반기를 돌리며 산소흡수도를 측정하기 시작한다. 자동 호흡측정기를 사용하는 경우 산소흡수도가 지속적으로 측정되나 자동이 아닌 경우 매일 측정값을 기록해야 한다.

3.3.2 측정된 값들로부터 산소흡수도를 계산한다. 배양 종료시에 플라스크내 용액의 pH를 측정한다.

3.3.3 필요한 경우 용존유기탄소 분석 또는 화학분석을 위해서 시험 시작과 종료시에

호흡측정기 플라스크로부터 시료를 채취하며, 처음 시료 채취시 플라스크에 남아 있는 시험물질 용량을 알고 있어야 한다(주 2).

3.3.4 일반적으로 생분해도는 이론적 산소요구량을 계산하여 구한다. 질소 함유 물질에 대해서는 질산화에 의한 산소섭취 보정이 필요하다. 질산화의 유무에 따라 질산화에 의한 이론적 산소요구량($\text{ThOD}_{\text{NO}_3}$, $\text{ThOD}_{\text{NH}_4}$)을 적용하여 계산한다. 만약 질산화가 완전하지 않다면 28 일 동안 아질산염과 질산염의 농도변화로부터 소비된 산소량을 계산하여 보정한다(주 2)(주 3).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험결과는 (주 6)의 양식을 참고하여 작성한다.

1.2 이론적산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}}{\text{ThOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}} \times 100$$

BOD : 시료의 생물화학적 산소요구량 mg(주 4)

ThOD : 이론적 산소요구량 mg(주 2)

1.3 화학적 산소요구량에 의한 생분해도(%)를 산출하는 방법

$$\text{생분해도}(\%) = \frac{\text{BOD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}}{\text{COD (mg O}_2 \text{ /mg 시험물질)}} \times 100$$

COD : 시료의 화학적 산소요구량 mg(주 2)

1.4 화학분석에 의한 분해도를 산출하는 방법(선택사항)

$$\text{분해도}(\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

S_a : 시험종료시 시험물질의 잔류량 측정값(mg/L)

S_b : 비생물적 대조군의 시험물질 잔류량 측정값(mg/L)

1.5 용존유기탄소 감소에 의한 분해도($D_t(\%)$)를 산출하는 방법(선택사항)

$$\text{분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

D_t : t 시간에서 분해도(%)

C_0 : 시간 0에서 시험물질군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(0)}$: 시간 0에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 초기 농도(mg DOC/L)

$C_{bl(t)}$: 시간 t에서 접종원 바탕대조군의 DOC 평균 농도(mg DOC/L)

1.6 표준물질과 시험물질이 포함된 독성대조군의 분해율이 14 일 내에 이론적 산소 요구량에 대해 25 % 또는 용존유기탄소에 대해 35 % 미만이라면 시험물질이 억제성 물질이라고 추정할 수 있다(주 5). 이러한 경우, 용존유기탄소 측정의 정확도를 떨어뜨리지 않는 수준의 낮은 농도에서 시험하거나, 부유물질 30 mg/L 이하를 넘지 않는 더 높은 농도 수준의 접종원을 처리하여 시험을 수행하는 방법, 또는 두 조건을 모두 적용하여 재시험 한다.

2. 시험결과의 적합성

2.1 시험병 6 (접종원 바탕시험군)의 산소흡수량은 일반적으로 20 mg O_2 /L ~ 30 mg O_2 /L이며, 28 일째에 60 mg O_2 /L을 넘어서는 안된다.

2.2 pH값이 6.0 ~ 8.5 범위를 벗어난 상태로 시험물질의 산소소모 정도가 60 % 미만이면 시험물질을 저농도로 하여 재시험한다.

2.3 정체기, 시험의 종료 또는 10 일 창의 마지막 날에 각 플라스크의 반복구 간의 분해도 값 차이가 20 % 미만이어야 한다.

2.4 표준물질의 이론적 산소요구량에 근거한 분해도 또는 용존유기탄소 감소에 의한 분해도가 14 일 내에 각각 60 % 또는 70 %에 도달해야 한다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

3.5 시험조건 : (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간

(2) 접종원 : 채취장소, 전처리 방법 및 농도 등

(3) 용해도가 낮은 시험물질의 시험용액 조제방법

(4) 시험방법 : 분해도 측정을 위해 사용한 방법(화학적 분석방법 포함)

3.6 시험결과 : (1) 도표로 산출된 형태의 자료

(2) 생분해도(%)

(3) 관찰된 억제현상

(4) 비생물 분해도

- (5) 특정 화학물질 분석 자료 및 화학적 분석에 의한 분해도
- (6) 중간 생성물에 대한 분석 자료(가능한 경우)
- (7) 분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex III.

주 2) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex IV.

주 3) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex V.

주 4) 생물화학적 산소요구량(BOD)값 산출 방법

$$\text{BOD} = \frac{\text{시험물질군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)} - \text{접종원 바탕시험군 산소흡수량 (mg O}_2\text{/L)}}{\text{mg 시험물질/L 시험병 용액}}$$
$$= \text{mg O}_2\text{/mg 시험물질}$$

주 5) OECD(1992). Test Guideline 301. Ready Biodegradability. Annex II.

주 6) 압력계를 이용한 산소 소모량 측정시험(Manometric Respirometry Test) 결과 작성 양식

1. 시험기관 :

2. 시험기간 :

3. 시험물질 :

- 시험물질명 :

- 시험물질 표준원액농도 : (mg/L)

- 배양액 내 시험초기농도, C_0 : (mg/L)

- 시험 플라스크 용량, V : (mL)

- 이론적 산소요구량 또는

화학적 산소요구량 : (mg O_2 /mg 시험물질(NH_4 , NO_3))

4. 접종원

- 채취지역 :

- 처리법 :

- 그 밖의 전처리 :

- 반응혼합물내의 접종원 농도 : (mL/L)

5. 생분해도

- 사용된 호흡측정기기 :

		시간(일)				
		n_1	n_2	n_3	n_4	n_x
시험물질군의 산소흡수량(mg)	a_1 a_2					
접종원 바탕시험군의 산소흡수량(mg)	b_1 b_2 b_m 평균					
보정된 산소흡수량(mg)	$(a_1 - b_m)$ $(a_2 - b_m)$					
BOD (mg O_2 /mg 시험물질)	$(a_1 - b_m)/C_0V$ $(a_2 - b_m)/C_0V$					
분해도, $D(\%)$	$D_{1(a1)}$ $D_{2(a2)}$					
$(BOD/ThOD) \times 100$	평균*					

* D_1 과 D_2 편차가 큰 경우에는 평균값을 계산하지 않는다.

주: 절차대조군과 독성대조군의 경우도 위와 유사한 양식을 활용한다.

6. 질산화 보정

	배양시간(일)		
	0	28	편차
(i) 질산염 농도(mg N/L)			(N)
(ii) 산소 등량($4.57 \times N \times V$) (mg)			
(iii) 아질산염 농도(mg N/L)			(N)
(iv) 산소 등량($3.43 \times N \times V$) (mg)			
(ii+iv) 총 산소 등량			

7. 탄소 분석(선택사항)

- 사용된 탄소분석기 :

시간(일)	시험물질군(mg/L)	접종원 바탕시험군(mg/L)
0	(C_0)	($C_{bl(0)}$)
28(또는 배양종료)	(C_t)	($C_{bl(t)}$)

$$\text{DOC 제거율(분해도)}(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_{bl(t)}}{C_0 - C_{bl(0)}} \right] \times 100$$

8. 화학분석에 의한 분해도(선택사항)

	시험종료시 시험물질 잔류량	분해도(%)
비생물 멸균 대조군	S_b	
배양된 기초배양액	S_a	$\frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$

9. 비생물 분해도

a = 시험종료시 비생물 멸균 대조군에서의 O_2 소모량(mg)

$$\text{시험물질 mg 당 } O_2 \text{ 소모량} = \frac{a}{C_0 V}$$

$$\text{비생물 분해도}(\%) = \frac{a}{C_0 V \times \text{ThOD}} \times 100$$

제7항 미생물분해시험(본질적 분해성) : MITI 수정시험 II

I. 개요

1. 목적

이 시험은 MITI 수정시험법(I)으로 낮은 분해성을 나타낸 화학물질의 본질적 생분해성을 평가하기 위하여, 생화학적 산소 요구량(BOD)을 측정하고 잔류 물질을 분석하는 데 목적이 있다.

이 시험은 증기압이 낮은 물질, 박테리아를 억제하지 않는 물질, 이산화탄소(CO_2) 흡착제와 접촉 및 반응하지 않는 물질에 적용 가능하다.

2. 정의

2.1 생물화학적 산소요구량(BOD, Biochemical oxygen demand)

시험물질이 미생물에 의하여 대사될 때 소비되는 산소량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

2.2 이론적 산소 요구량(ThOD, Theoretical oxygen demand)

시험물질을 완전하게 산화시키는데 이론적으로 필요한 산소의 총량으로 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시

II. 시험

1. 원리

자동 폐쇄계 산소 소비량 측정 기구(BOD-meter)를 사용한다(주 1). 시험 물질은 시험물질에 적응되지 않은 미생물과 함께 시험관에 접종한다. 시험 기간 동안 생물화학적 산소 소비량은 BOD-meter를 이용해 지속적으로 측정한다. 생분해도는 BOD에 기초하여 용존 유기 탄소 농도, 잔류 화학물질 농도 측정과 같은 주기적인 화학 분석으로 계산한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

- 2.1.1 이산화탄소 흡수제를 담을 수 있는 밀폐 가능한 300 mL 용량의 병 6 개로 구성된 자동 생물화학적 산소요구량 측정기 또는 호흡측정기
- 2.1.2 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 온도를 유지할 수 있는 항온배양기 또는 항온수조
- 2.1.3 용존산소 측정기
- 2.1.4 pH 측정기
- 2.1.5 액체크로마토그래피 등 시험물질 분석기기
- 2.1.6 탄소분석기(선택사항) 등

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액의 원액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 원액을 조제한다.

2.3.1 원액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·12수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	44.60 g
염화암모늄(NH_4Cl)	1.70 g

- 각각 물에 용해시켜 총 1 L가 되도록 만들고, pH 7.2로 맞춘다.

2.3.2 원액 B

황산마그네슘·7수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	22.50 g
--	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 원액 C

무수염화칼슘(CaCl_2 , Anhydrous)	27.50 g
--------------------------------------	---------

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 원액 D

염화철(III)·6수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액은 2.3항에서 조제한 기초배양액 원액 A, B, C 및 D를 각 3 mL 씩 취하고 물을 가하여 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

새로운 물질을 조사하는 경우에 표준물질은 유용할 수 있다. 접종원의 활성을 확인하기 위해서 표준물질 사용이 바람직하며, 아닐린($\text{C}_6\text{H}_5\text{N}$), 아세트산나트륨($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$) 또는 벤조산나트륨($\text{C}_7\text{H}_5\text{NaO}_2$)이 사용된다. 만약 산소 소비량으로 계산한 아닐린의 분해도가 40 %(7 일 후), 65 %(14 일 후)를 초과하지 않은 경우 그 시험은 무효로 처리한다.

2.6 시험병의 준비

6 개의 시험병을 다음과 같이 준비한다.

시험병1 : 물 300 mL + 시험물질 9 mg [비생물적 대조군]

시험병2, 3, 4 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 30 mg(건조량) + 시험물질 9 mg [시험물질군]

시험병5 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 9 mg(건조량) + 표준물질 30 mg [활성도 대조군]

시험병6 : 기초배양액 300 mL + 활성슬러지 30 mg(건조량) [바탕시험군]

2.7 시험조건

(1) 시험물질의 농도 : 30 mg/L

(2) 활성슬러지 농도 : 100 mg/L

- (3) 시험온도 : $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$
- (4) 시험기간 : 14 일 ~ 28 일
- (5) 암조건에서 수행한다. 온도와 배양용기 내용물의 색 변화를 매일 확인한다.
- (6) 교반기를 이용하여 강하게 교반한다.

2.8 시험물질

원하는 시험농도에서 시험물질이 물에 녹지 않는 경우, 시험 물질을 가능한 곱게 분쇄하여 사용해도 된다. 시험 물질이 휘발성인 경우, 증발을 막기 위해 시험 물질을 냉각시킨다.

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 채취

전국을 대상으로 하여 적어도 10 군데 이상의 장소에서 채취해야 하며, 주로 다양한 화학물질이 많이 사용되고 폐기되는 지역의 도시하수처리장(3 군데), 산업 폐수처리장(1 군데), 강(3 군데), 호수(1 군데), 바다(2 군데) 등에서 채취한다.

3.1.2 채취횟수

연 4 회, 3 개월 간격(3월, 6월, 9월 및 12월)으로 채취한다.

3.1.3 채취시료

(1) 도시하수 : 활성슬러지 1 L

(2) 강, 호수, 습지, 바다 : 표층수 1 L, 공기와 접촉하는 물가의 표토 1 L

3.1.4 운반

채취한 접종원 시료를 용기에 넣고 공기를 공급하면서 운반한다.

3.1.5 접종원의 배양 및 슬러지의 활성화

여러 지역에서 채취해 온 활성슬러지를 같은 용기에 섞고 부유물질을 제거한 후 놓아둔다. 상등액의 pH를 수산화나트륨 또는 인산을 이용하여 7.0 ± 1.0 로 조정 후 여과한다.

여과된 상등액 적정량을 활성슬러지 배양조에 옮겨 약 23.5 시간 동안 공기를 공급하고, 그 후 30 분간 공기 공급을 중단한 후 전체 부피의 1/3 에 해당하는 상등액을 제거하고 같은 양의 0.1 % 합성배지(주 2)를 넣은 후 다시 공기를 공급한다. 배양기간 동안 0.1 %의 합성배지는 1 일 1회 공급하며 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH는 7 ± 1 를 유지한다.

3.1.6. 접종원의 관리

배양단계에서 관리는 다음의 항목을 점검하여 필요한 조치를 취한다.

3.1.6.1 상등액의 성상 : 상등액은 투명하여야 한다.

3.1.6.2 침전성 : 큰 덩어리의 활성슬러지는 침전성이 뛰어나야 한다.

3.1.6.3 생성상태 : 미생물군집이 증가하지 않는 경우에는 0.1 % 합성배지의 첨가량 또는 첨가회수를 증가시킨다.

3.1.6.4 pH : 상등액의 pH는 7 ± 1 을 유지한다.

3.1.6.5 온도 : 배양온도는 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다.

3.1.6.6 공기공급량 : 배양액 중 용존산소농도가 5 mg/L 이상이 되도록 한다.

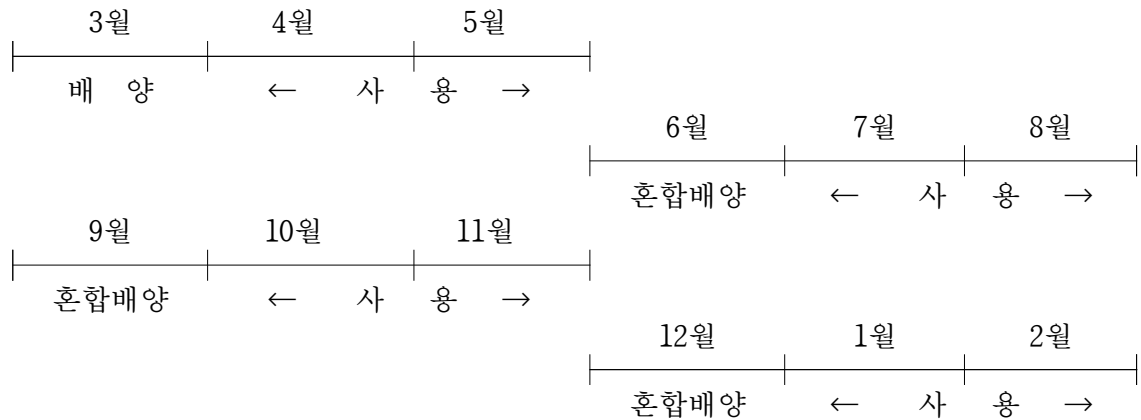
3.1.6.7 생물상 : 현미경(100 배율 ~ 400 배율)으로 관찰했을 때 구름모양의 미생물 군집과 함께 원생동물이 발견되어야 한다.

3.1.7 신·구접중원의 혼합

신·구접중원의 동일한 활성도를 유지하기 위하여 현재 시험에 사용 하고 있는 활성슬러지 상등액을 여과한 여액과 새로 채취한 접종원 혼합물의 여과한 상등액을 같은 양씩 혼합하여 배양한다.

3.1.8. 접종원 활성도 점검

표준물질을 사용하여 적어도 3 개월마다 1 회씩 정기적으로 접종원으로 사용되는 활성슬러지의 활성도를 점검한다. 특히 신·구접중원을 혼합할 때는 접종원의 활성도 점검이 필요하다. 접종원의 준비 및 사용에 관한 예는 다음과 같다.



< 접종균의 준비 및 사용기간에 관한 예 >

3.2 접종

다음 시험관들을 준비하고, 시험 온도에 맞춘다.

- (1) 시험 물질이 30 mg/L (W/V)이 되도록 기초 배양액을 넣은 시험관
- (2) 바탕시험을 위해, 기초 배양액만을 넣은 시험관
- (3) 시험 물질이 30 mg/L (W/V)이 되도록 물을 넣은 시험관
- (4) 아닐린 또는 다른 표준물질이 100 mg/L (W/V)이 되도록 기초 배양액을 넣은 시험관

부유물질(100 μ L/L V/V)의 농도(주 3)가 되도록 위의 시험관 (1), (2)에 접종한다.

3.3 생분해도 시험

3.3.1 BOD 곡선은 14 일 ~ 28 일 동안 자동화된 시설을 이용하여 연속적으로 얻은 자료를 통하여 구한다. 시험 14 일 ~ 28 일 후, 시험관의 pH, 잔류 물질, 중간체를 분석한다. 시험기간 동안 시험물질의 변화나, 압력 또는 시험관 벽에 의한 흡착 등으로 원 시험 물질의 손실은 없는지 분석하기 위해 활성슬러지가 없는 시험관의 시험물질도 분석한다.

3.3.2 시험 물질이 수용성인 경우, 총유기탄소의 잔류량 역시 측정한다. 총 유기탄소 분석기를 사용하는 경우, 시험관에서 시험 용액 10 mL를 취하여 5 분간

3000 ×g로 원심분리한다. 상등액 내의 총유기탄소 잔류량은 총유기탄소 분석기로 결정한다.

다른 분석기를 사용하는 경우, 시험 물질에 적합한 용매로 시험관의 총 내용물을 추출하여 농축과 같은 적절한 전처리 후, 분석기기(기체 크로마토그래피, 흡수 분석법, 질량 분석법, 원자 흡광 광도법 등)를 이용하여 시험 물질의 잔류량을 결정한다.

3.3.3 휘발성 물질인 경우, 증발을 막기 위해 BOD-meter의 온도 제어 수조는 10℃로 냉각되어야 하며, 이 온도는 최소 30 분간 유지되어야 한다. 이 후 분석과정 3.3.2 를 시작한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

1.1 생물화학적 산소요구량 측정에 의한 생분해도(%) 산출

$$\text{생분해도(\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{ThOD}} \times 100 (\%)$$

BOD : BOD 곡선에서 측정된 시험 물질의 BOD

B : BOD 곡선에서 측정된 기초배양액의 BOD

ThOD : 시험물질이 완전히 산화되는데 필요한 이론적 산소요구량
계산 값(mg)

1.2 화학분석에 의한 분해도(%) 산출

$$\text{분해도(\%)} = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100 (\%)$$

Sa : 생분해시험 종료 후 시험물질의 잔류량 측정값(mg)

Sb : 두 개의 바탕시험 시험물질 잔류량 측정값(mg)

2. 시험결과의 적합성

2.1 표준 물질과의 비교를 위해, 시험 물질의 생분해성을 표준물질(아닐린)의 생분해성과 비교한 상대적인 분해도에 기초하여 분류한다. 이러한 시험 조건에서, 기초 산소 소비의 편차는 표준 시험 조건에서의 값보다 훨씬 크다.

2.2 산소소비량으로부터 구한 표준물질(아닐린) 생분해도가 7 일 후에 40 % 또는 14 일 후에 65 %가 넘지 않는 경우, 접종원의 활성도에 문제가 있으므로 이 시험은 부적합한 것으로 간주하고 다시 수행한다.

3. 결과의 평가

3.1 이론적 산소 요구량의 계산

원소	산화형
C	CO ₂
H	H ₂ O
N	NO ₂
S	SO ₂
X (halogen)	X

3.2 분석방법의 회수율

4. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

4.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

4.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

4.3 시험시작일 및 종료일, 시험기간

4.4 시험대상물질

(1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)

(2) 입수처, 입수일

(3) 순도(%), 불순물

(4) 분자량 및 물리화학적 성질

4.5 시험조건

- (1) 시험온도, 시험농도 및 시험기간
- (2) 활성슬러지 : 채취장소, 농도 등
- (3) 분석방법 : 전처리, 기구의 분석 조건, 분석의 회수율, 중간체 식별

4.6 시험결과

- (1) BOD 곡선 및 기계명
- (2) BOD (mg)
- (3) B (mg)
- (4) Sa, Sb (mg)
- (5) TOD (mg)
- (6) BOD에 의한 분해도, 화학적 분석에 의한 분해도
- (7) 분석을 위해 사용한 시험 물질의 크로마토그램 또는 스펙트럼

4.7 시험결과에 대한 고찰

주 1) OECD (1981). Test Guideline 302C. Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II). Annex 1.

주 2) 0.1 %의 합성배지 : 포도당, 펩톤 및 인산칼륨 각각 1 g을 물 1 L에 녹이고 수산화나트륨을 이용하여 pH를 7 ± 1 로 조절.

주 3) OECD (1981). Test Guideline 302C. Inherent Biodegradability: Modified MITI Test (II). Annex 2.

제8항 토양미생물 영향 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 토양 내 미생물의 미치는 영향을 평가하는데 목적이 있다. 화학물질에 노출된 토양미생물의 탄소 및 질소 변환능을 관찰함으로써 화학물질의 독성을 평가한다.

2. 정의

2.1 탄소변환(Carbon transformation)

미생물이 유기물질을 분해하여 최종적으로 이산화탄소를 생성하는 과정

2.2 질소변환(Nitrogen transformation)

질소가 포함된 유기물을 암모니아 생성 및 질산화 과정을 통하여 최종적으로 무기 질산염을 생성하는 미생물에 의한 분해과정

2.3 EC_x(Effective concentration)

탄소변환 혹은 질소변환에 있어 x %의 저해효과를 나타내는 시험물질의 농도

2.4 EC₅₀(Medium effective concentration)

탄소변환 혹은 질소변환에 있어 50 %의 저해효과를 나타내는 시험물질의 농도

II. 시험

II-1. 질소 변환능 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

식물보호제, 비료, 삼림용화학물질 등의 농업용 화학물질인 경우에는 탄소 변환 시험과 질소 변환 시험을 모두 실시하여야 하나 비농업용 화학물질의 경우에는 질소 변환 시험만으로 충분하다. 그러나 비농업용 화학물질의 경우에도 질소 변환 시험에서 EC₅₀ 값이 상업적으로 판매되는 질산화저해제(예; Nitrapyrin)의

효과범위에 드는 경우, 더 많은 정보를 얻기 위해 탄소 변환 시험을 실시할 수도 있다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기 : 화학적 작용을 일으키지 않는 재료로 만들어 진 것을 사용하여야 하며 용적의 1/4 가량이 토양시료로 채워지도록 한다. 수분 손실을 최소화하면서 시험기간 동안 기체 교환이 잘 이루어지도록 하여야 하며(예; 시험용기를 구멍이 있는 폴리에틸렌 호일로 덮어둠) 휘발성 물질을 시험하는 경우, 밀폐가 가능하여 기체의 손실을 줄일 수 있는 용기를 사용하여야 한다.

1.2.2 교반장치 : 기계적 교반기 또는 이에 상응하는 장치

1.2.3 3,000 ×g의 원심분리기 또는 여과장치(질산이 포함되지 않은 여과지 사용)

1.2.4 질산염 분석을 위해 적합한 감도를 지닌 효과적인 분석기기

1.3 토양

1.3.1 토양 조건 : 모래함유량 50 % ~ 75 %, pH 5.5 ~ pH 7.5, 유기탄소함유량 0.5 % ~ 1.5 %인 단일 토양을 사용한다. 토양내의 미생물량을 측정하여야 하며 이때 미생물의 탄소량이 전체 유기탄소량의 1 % 이상이 되어야 한다. 이러한 조건의 토양은 시험물질의 흡착이 최소화되고 미생물 활용도가 최대가 되어 다른 토양에 대한 시험은 불필요하나, 시험물질이 정전기적 전하를 띠고 있거나 산성도 높은 삼림에 사용되는 등 특별한 상황이라면 가능한 범위에서 다른 토양을 이용한 추가실험을 수행할 것을 권장한다.

1.3.2 토양의 채취 : 토양은 다음과 같은 조건을 만족하는 곳에서 채취한다.

- (1) 장기적인 채취가 가능한 곳
- (2) 영구목초지, 연작곡물(옥수수는 제외), 고밀도의 녹비를 가진 토양이 적당
- (3) 최소 1 년간 식물보호제를 살포하지 않은 곳, 또한 최소 6 개월간 유기질 비료를 살포하지 않은 곳, 최소 3 개월간 무기질 비료를 살포하지 않은 곳
- (4) 살균성 재제(예; Calcium cyanamide (CaNCN))가 사용되지 않은 곳

(5) 30 일 이상 장기간 가뭄이나 홍수가 있던 지역에서는 가뭄이나 홍수중또는 그 직후에는 토양 채취를 하지 않는다.

경작이 진행된 토양에서는 0 cm ~ 20 cm 깊이의 토양을 채취하고, 목초지나 녹지 혹은 최소 한번의 경작기간 이상 경작을 하지 않은 지역의 토양은 최대 25 cm 깊이까지 채취해도 된다.

1.3.3 토양의 운반 및 보관 : 토양시료는 최초 특성에 영향을 미치지 않는 용기 및 온도 조건에서 운반한다. 야외에서 채취한 토양을 바로 사용하는 것을 권장하며, 불가피하게 실험실에서 보관할 때는 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 3 개월까지 보관할 수 있다. 토양의 보관은 공기가 통하게 하여 호기적 조건을 유지시켜야 한다. 만약 연간 3 개월 이상 얼어있는 지역에서 채취한 토양이라면 $-18\text{ }^{\circ}\text{C} \sim -22\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다. 보관된 토양은 실험하기 전 미생물량을 측정하여야 하며, 그 탄소량이 전체 탄소량의 1 % 이상인 것을 확인하여야 한다.

1.3.4 시험토양의 취급 및 준비

(1) 보관한 토양을 사용할 경우, 본시험과 유사한 조건에서 2 일 ~ 28 일간 사전 배양한다.

(2) 체로 걸러 2 mm 이하의 입자만 사용하고, 수분함량은 증류수나 탈이온수를 이용하여 40 % ~ 60 %로 조절한다.

(3) 적당한 유기물(예; 알팔파 분말)을 이용하여 C/N비를 12 ~ 16으로 조정한다.

1.4 시험물질

1.4.1 물 혹은 모래(입자크기 : 0.1 mm ~ 0.5 mm)를 매개체로 이용한다. 모래를 이용할 경우 시험물질을 녹이거나 적절한 용매에 현탁한 후 모래에 피복하고, 용매를 모두 휘발시킨 다음 토양 kg 당 모래 10 g의 비율로 섞어 사용한다. 대조군은 시험군에 들어간 매개체를 같은 양 혼합하여 사용한다.

1.4.2 시험농도

(1) 농업용 화학물질 : 최소 2 개 농도군을 사용한다. 저농도는 경작지에서 실제로 사용되는 가장 높은 농도를, 고농도는 저농도의 배수가 되도록 한다. 토양에 직

접 사용되는 농업용 화학물질이나 토양에 도달하는 양을 예측할 수 있는 화학물질인 경우, 최대 예측환경농도의 5 배의 농도로 할 것을 권장한다. 한 경작기간 내에 여러번 사용되는 물질인 경우, 최대 예측환경농도에 사용 횟수를 곱하여 시험농도를 결정하며 이 때 최대 시험농도는 1 회 최대 시비율의 10 배를 넘지 않도록 한다.

(2) 비농업용 화학물질 : 일정한 공비로 5 개의 농도군을 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

체로 거른 토양에 식물가루와 시험물질을 첨가한 후 배양 0 일, 7 일, 14 일, 28 일 후에 질산염의 양을 측정하여 시험군과 대조군의 질산염 생성률을 비교한다. 비농업용 화학물질의 경우는 28 일 이후에 질산염 생성율을 측정하여 회귀분석 및 ECx 값(EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀)을 산출한다.

2.2 시험의 유효성

농업용 화학물질의 평가시 대조군과 시험군간의 질산염 생성율 차이가 25 % 이하일 때 토양의 질소변환능에 대한 장기간의 영향이 없다는 것으로 인정한다. 따라서 시험의 유효성을 위하여 대조군의 반복군간 변이도는 $\pm 15\%$ 이내 이어야 한다.

2.3 시험

2.3.1 농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 2 개 시험군, 비농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 5 개 시험군으로 하며 대조군 및 시험군 최소 3 반복군으로 시험한다.

2.3.2 토양시료의 배양은 대조군, 시험군별로 토양 전체를 배양하는 방법과 대조군, 시험군별 여러개의 크기로 나누어 각각 배양하는 방법이 있다. 하지만 휘발성 물질을 시험할 때에는 미리 토양을 분배한 후 배양하여야 한다.

2.3.3 모든 시험은 무기호흡 상태를 방지하기 위하여 상부 공간이 넉넉한 용기를 사용하여야 한다.

2.3.4 시험은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 어두운 곳에서 수행한다.

2.3.5 시험 기간동안 토양의 수분 함유율은 40 % ~ 60 % 범위에서 $\pm 5\%$ 이내로 유지되어야 한다. 이의 조정을 위하여 증류수나 이온제거수를 첨가할 수 있다.

2.3.6 시험은 최소 28 일 이상 수행하여야 한다. 농업용 화학물질 시험에서 28 일째 대조군과 시험군의 질산염 농도가 25 % 이상의 차이가 나는 경우, 그 차이가 25 % 이내로 줄어들 때 까지 혹은 100 일까지 시험을 계속한다. 비농업용 화학물질을 시험할 경우는 28 일째 시험을 종료하고 EC_x 값을 계산한다.

2.4 시료의 분석

2.4.1 농업용 화학물질을 시험할 때에는 0 일, 7 일, 14 일, 28 일째 시료를 분석한다. 이후 시험이 계속될 때에는 매 14 일 간격으로 측정을 계속한다.

2.4.2 비농업용 화학물질의 경우에는 시험개시일 및 28 일째 질산염 함유량을 측정한다. 필요할 경우 7 일째에 중간 측정을 할 수도 있다.

2.4.3 시료 건조중량당 5 mL의 추출용매(예; 0.1 M 염화칼륨)를 첨가한 후 150 rpm에서 60 분간 교반하고 원심분리한 후 상등액의 질산염 농도를 확인한다. 상등액은 $-20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다.

II-2. 탄소 변환능 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험에 대한 정보

식물보호제, 비료, 삼림용화학물질 등의 농업용 화학물질인 경우에는 탄소 변환 시험과 질소 변환 시험을 모두 실시하여야 하나 비농업용 화학물질의 경우에는 질소 변환 시험만으로 충분하다. 그러나 비농업용 화학물질의 경우에도 질소 변환 시험에서 EC₅₀ 값이 상업적으로 판매되는 질산화저해제(예; Nitrapyrin)의 효과범위에 드는 경우, 더 많은 정보를 얻기 위해 탄소 변환 시험을 실시할 수도 있다.

1.2 장치 및 기구

1.2.1 시험용기 : 화학적 작용을 일으키지 않는 재료로 만들어 진 것을 사용하여야 하며 용적의 1/4 가량이 토양시료로 채워지도록 한다. 수분 손실을 최소화하면서 시험기간 동안 기체 교환이 잘 이루어지도록 하여야 하며(예; 시험용기를 구멍이 있는 폴리에틸렌 호일로 덮어둠) 휘발성 물질을 시험하는 경우, 밀폐가 가능하여 기체의 손실을 줄일 수 있는 용기를 사용하여야 한다.

1.2.2 포도당 유도 호흡을 측정 : 이산화탄소 생산량이나 산소소비량을 측정하기 위한 배양시스템과 도구가 필요하다.

1.3 토양

1.3.1 토양 조건 : 모래함유량 50 % ~ 75 %, pH 5.5 ~ pH 7.5, 유기탄소함유량 0.5 % ~ 1.5 %인 단일 토양을 사용한다. 토양내의 미생물량을 측정하여야 하며 이때 미생물의 탄소량이 전체 유기탄소량의 1 % 이상이 되어야 한다. 이러한 조건의 토양은 시험물질의 흡착이 최소화되고 미생물 활용도가 최대가 되어 다른 토양에 대한 시험은 불필요하나, 시험물질이 정전기적 전하를 띠고 있거나 산성도 높은 삼림에 사용되는 등 특별한 상황에서는 다른 토양을 이용한 추가실험이 필요하다.

1.3.2 토양의 채취 : 토양은 다음과 같은 조건을 만족하는 곳에서 채취한다.

- (1) 장기적인 채취가 가능한 곳
- (2) 영구목초지, 연작곡물(옥수수는 제외), 고밀도의 녹비를 가진 토양이 적당
- (3) 최소 1 년간 식물보호제를 살포하지 않은 곳, 또한 최소 6 개월간 유기질 비료를 살포하지 않은 곳, 최소 3 개월간 무기질 비료를 살포하지 않은 곳
- (4) 살균성 재제(예; Calcium cyanamide (CaNCN))가 사용되지 않은 곳
- (5) 30 일 이상 장기간 가뭄이나 홍수가 있던 지역에서는 가뭄이나 홍수 중 또는 그 직후에는 토양 채취를 하지 않는다.

경작이 진행된 토양에서는 0 cm ~ 20 cm 깊이의 토양을 채취하고, 목초지나 녹지 혹은 최소 한번의 경작기간 이상 경작을 하지 않은 지역의 토양은 최대 25 cm 깊이까지 채취해도 된다.

1.3.3 토양의 운반 및 보관 : 토양시료는 최초 특성에 영향을 미치지 않는 용기 및 온도 조건에서 운반한다. 야외에서 채취한 토양을 바로 사용하는 것을 권장하며, 불가피하게 실험실에서 보관할 때는 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 3 개월까지 보관할 수 있다. 토양의 보관은 공기가 통하게 하여 호기적 조건을 유지시켜야 한다. 만약 연간 3 개월 이상 얼어있는 지역에서 채취한 토양이라면 $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 6 개월간 보관이 가능하다. 보관된 토양은 실험하기 전 미생물량을 측정하여야 하며, 그 탄소량이 전체 탄소량의 1 % 이상인 것을 확인하여야 한다.

1.3.4 시험토양의 취급 및 준비

- (1) 보관한 토양을 사용할 경우, 본시험과 유사한 조건에서 2 일 ~ 28 일간 사전배양한다.
- (2) 체로 걸러 2 mm 이하의 입자만 사용하고, 수분함량은 증류수나 이온제거수를 이용하여 40 % ~ 60 %로 조절한다.
- (3) 호흡반응을 최대로 유도하기 위해 토양에 포도당을 충분히 첨가한다. 첨가량은 예비시험으로 결정할 수 있지만 유기탄소 0.5 % ~ 1.5 %를 포함한 사토의 경우, 건조토양 1 kg 당 2 g ~ 4 g의 포도당을 투여하면 충분하다.

1.4 시험물질

1.4.1 물 혹은 모래(입자크기 : 0.1 mm ~ 0.5 mm)를 매개체로 이용한다. 모래를 이용할 경우 시험물질을 녹이거나 적절한 용매에 현탁한 후 모래에 코팅하고, 용매를 모두 휘발시킨 다음 토양 kg 당 모래 10 g의 비율로 섞어 사용한다. 대조군은 시험군에 들어간 매개체를 같은 양 혼합하여 사용한다.

1.4.2 시험농도

- (1) 식물보호제 혹은 환경중 농도가 예상되는 물질 : 최소 2 개 농도군을 사용한다. 저농도는 경작지에서 실제로 사용되는 가장 높은 농도를, 고농도는 저농도의 배수가 되도록 한다. 토양에 직접 사용되는 농업용 화학물질이나 토양에 도달하는 양을 예측할 수 있는 화학물질인 경우, 최대 예측환경농도의 5 배의 농도로 할 것을 권장한다. 한 경작기간 내에 여러번 사용되는 물질인 경우, 최대 예측환

경농도에 사용 횟수를 곱하여 시험농도를 결정하며 이 때 최대 시험농도는 1 회 최대 시비율의 10 배를 넘지 않도록 한다.

(2) 비농업용 화학물질 : 일정한 공비로 5 개의 농도군을 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

체로 거른 토양에 포도당과 시험물질을 첨가한 후 배양 0 일, 7 일, 14 일, 28 일 후에 포도당으로 인해 변한 호흡율을 12 시간 연속으로 측정하여 시험군과 대조군의 호흡율을 비교한다. 비농업용 화학물질의 경우는 28 일 이후에 호흡량의 변화를 측정하여 회귀분석 및 EC_x 값(EC₅₀, EC₂₅, EC₁₀)을 산출한다.

2.2 시험의 유효성

농업용 화학물질의 평가시 대조군과 시험군간의 이산화탄소 생성량 혹은 산소 소모량의 차이가 25 % 이하일 때 토양의 탄산변환능에 대한 장기간의 영향이 없다는 것으로 인정한다. 따라서 시험의 유효성을 위하여 대조군의 반복군간 변이도는 $\pm 15\%$ 이내이어야 한다.

2.3 시험

2.3.1 농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 2 개 시험군, 비농업용 화학물질은 1 개 대조군 및 5 개 시험군으로 하며 대조군 및 시험군 최소 3 반복군으로 시험한다.

2.3.2 토양시료의 배양은 대조군, 시험군별로 토양 전체를 배양하는 방법과 대조군, 시험군별 여러개의 크기로 나누어 각각 배양하는 방법이 있다. 하지만 휘발성 물질을 시험할 때에는 미리 토양을 분배한 후 배양하여야 한다.

2.3.3 모든 시험은 무기호흡 상태를 방지하기 위하여 상부 공간이 넉넉한 용기를 사용하여야 한다.

2.3.4 시험은 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 어두운 곳에서 수행한다.

2.3.5 시험 기간동안 토양의 수분 함유율은 40 % ~ 60 % 범위에서 ± 5 % 이내로 유지되어야 한다. 이의 조정을 위하여 증류수나 이온제거수를 첨가할 수 있다.

2.3.6 시험은 최소 28 일 이상 수행하여야 한다. 농업용 화학물질 시험에서 28 일째 대조군과 시험군의 이산화탄소 생산량 혹은 산소소비량이 25 % 이상의 차이가 나는 경우, 그 차이가 25 % 이내로 줄어들때까지 혹은 100 일까지 시험을 계속한다. 비농업용 화학물질을 시험할 경우는 28 일째 시험을 종료하고 ECx 값을 계산한다.

2.4 시료의 분석

2.4.1 농업용 화학물질을 시험할 때에는 0 일, 7 일, 14 일, 28 일째 시료를 분석한다. 이후 시험이 계속될 때에는 매 14 일 간격으로 측정을 계속한다.

2.4.2 비농업용 화학물질의 경우에는 시험개시일 및 28 일째 포도당 유도 호흡율을 측정한다. 필요할 경우 7 일째에 중간 측정을 할 수도 있다.

2.4.3 포도당이 첨가된 토양을 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 배양하면서 한 시간 혹은 두 시간 간격으로 12 시간 연속으로 호흡율을 측정한다. 가능한 한 포도당 투여 2 시간 내에 측정을 시작하여 12 시간동안 생산된 이산화탄소 총량 혹은 소비된 산소 총량을 측정하여 평균 호흡률을 계산한다.

III. 시험결과 및 보고

III-1. 질소 변환능 시험

1. 결과의 처리

농업용 화학물질의 경우는 각 반복군에서 생성된 질산염의 평균값으로부터 질산 변환율을 F-test 5 % 유의수준으로 처리하며 비농업용 화학물질을 시험한 경우에는 각 반복군에서 생성된 질산염의 양을 용량반응곡선으로 만들어 신뢰한계 95 %에서 ECx 값을 구한다. 질산염의 양은 토양건조중량 kg당 하루에 생산되는 mg(mg nitrate/kg dry weight soil/day)으로 표시한다.

한편 고농도의 질소를 포함한 시험물질은 질산염 생성농도에 큰 영향을 줄 수

있다. 이런 경우에는 적절한 대조군을 사용하여야 하며, 이 대조군에서 얻어진 결과 역시 ECx 계산에 포함하여야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 사용된 토양의 세부정보

- (1) 토양 채취지점의 지리적 정보(위도 및 경도)
- (2) 토양 채취지점의 이력(식생, 식물보호제 및 비료 처리 여부, 오염사고 여부 등)
- (3) 토양의 사용 형태(농경지, 삼림 등)
- (4) 채취 깊이(cm)
- (5) 모래, 미사, 점토 함유량(% 건조중량)
- (6) 토양의 pH(물에 타서 측정)
- (7) 유기탄소 함유량(% 건조중량)
- (8) 질소 함유량(% 건조중량)
- (9) 초기 질산염 농도(mg nitrate/kg 건조중량)
- (10) 양이온 교환능(mmol/kg)
- (11) 전체 유기탄소에 대한 미생물 함량(%)
- (12) 각 매개변수를 결정하는데 사용한 참고문헌
- (13) 토양시료의 채취 및 저장에 관련된 모든 정보
- (14) 사전배양을 실시한 경우, 그에 대한 상세한 정보

2.4 시험물질

- (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
- (2) 입수경위, 제조년월일
- (3) 구조식
- (4) 순도(식물보호제의 경우, 활성물질의 % 표시), 질소함유량
- (5) 물리적 특성 및 물리화학적 성상

2.5 기질

- (1) 기질의 공급처
- (2) 구성(예; 알팔파 가루)
- (3) 탄소 및 질소함량(% 건조중량)
- (4) 기질을 거른 체의 크기(mm)

2.6 시험조건

- (1) 토양에 첨가한 유기물에 대한 세부사항
- (2) 사용된 시험물질의 농도군의 수 및 농도 선정 근거
- (3) 시험물질을 토양에 사용한 방법에 대한 세부사항
- (4) 배양온도
- (5) 시험 개시시점 및 시험 기간 동안의 수분 함량
- (6) 토양배양 방법(전체를 한꺼번에 배양하였는지, 크기별로 나누어 배양하였는지의 여부)
- (7) 반복군의 수
- (8) 시료채취 시간
- (9) 토양에서 질산염 추출방법

2.7 시험결과

- (1) 질산염 분석에 사용한 장비와 분석절차
- (2) 질산염 측정치의 개별값 및 평균값을 정리한 표
- (3) 시험군 및 대조군의 반복실험 변화량
- (4) 계산에서 보정이 이루어진 경우 이에 대한 설명
- (5) 시료채취 시점별 질산염 생성 변이도. 95% 신뢰도에서 EC_{50} , 신뢰구간별 EC_{25} , EC_{10} . 용량반응곡선 그래프
- (6) 통계방법 및 결과 해석
- (8) 시험결과 해석에 도움을 줄 수 있는 모든 정보
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

III-2. 탄소 변환능 시험

1. 결과의 처리

농업용 화학물질의 경우는 각 반복군의 호흡률의 평균값을 표로 제시하고 적절한 통계적 방법(예; F-test 5 % 유의수준)으로 처리하며 비농업용 화학물질을 시험한 경우에는 각 반복군의 호흡률을 용량반응곡선으로 만들어 신뢰한계 95 %에서 EC_x 값을 구한다. 호흡률은 토양건조중량 kg당 1 시간에 생산되는 이산화탄소의 양(mg CO₂/kg dry weight soil/h) 혹은 토양건조중량 kg당 1 시간에 소비되는 산소의 양(mg O₂/kg dry weight soil/h)으로 표시한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과를 보고할 때는 아래의 내용이 포함되어야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 사용된 토양의 세부정보

- (1) 토양 채취지점의 지리적 정보(위도 및 경도)
- (2) 토양 채취지점의 이력(식생, 식물보호제 및 비료 처리 여부, 오염사고 여부 등)
- (3) 토양의 사용 형태(농경지, 삼림 등)
- (4) 채취 깊이(cm)
- (5) 모래, 미사, 점토 함유량(% 건조중량)
- (6) 토양의 pH(물에 타서 측정)
- (7) 유기탄소 함유량(% 건조중량)
- (8) 질소 함유량(% 건조중량)
- (9) 양이온 교환능(mmol/kg)
- (10) 전체 유기탄소에 대한 미생물 함량(%)
- (11) 각 매개변수를 결정하는데 사용한 참고문헌
- (12) 토양시료의 채취 및 저장에 관련된 모든 정보
- (13) 사전배양을 실시한 경우, 그에 대한 상세한 정보

2.4 시험물질

- (1) 화학물질의 명칭(CAS 번호, 일반명, 상품명)
- (2) 입수경위, 제조년월일
- (3) 구조식
- (4) 순도(식물보호제의 경우, 활성물질의 % 표시), 질소함유량
- (5) 물리적 특성 및 물리화학적 성상

2.5 시험조건

- (1) 토양에 첨가한 유기물에 대한 세부사항
- (2) 사용된 시험물질의 농도군의 수 및 농도 선정 근거
- (3) 시험물질을 토양에 사용한 방법에 대한 세부사항
- (4) 배양온도
- (5) 시험 개시시점 및 시험 기간 동안의 수분 함량
- (6) 토양배양 방법(전체를 한꺼번에 배양하였는지, 크기별로 나누어 배양하였는지의 여부)
- (7) 반복군의 수
- (8) 시료채취 시간

2.6 시험결과

- (1) 호흡률 측정에 사용한 장비
- (2) 이산화탄소 생산량 혹은 산소 소모량의 개별값 및 평균값을 정리한 표
- (3) 시험군 및 대조군의 반복실험 변화량
- (4) 계산에서 보정이 이루어진 경우 이에 대한 설명
- (5) 시료채취 시점별 변화한 포도당 유도 호흡률(%). 95 % 신뢰도에서 EC_{50} , 신뢰 구간별 EC_{25} , EC_{10} . 용량반응곡선 그래프
- (6) 통계방법 및 결과 해석
- (8) 시험결과 해석에 도움을 줄 수 있는 모든 정보
- (9) 결과에 대한 고찰 및 결론

제9항 생물농축성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 어류의 체내에 들어 왔을 때, 체내에 축적되는 정도를 측정하여 화학물질의 생물농축성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 생물농축(Bioconcentration)

물에 녹아 있는 화학물질이 직접 수서생물의 체내로 들어와서 체내에 남아 있는 것

2.2 생물농축계수(BCF, Bioconcentration factor)

생물농축이 평형상태에 도달한 상태에서 생물체내의 시험물질 농도를 물에서의 농도로 나눈 비율

2.3 흡수(Uptake)

시험물질이 흡입과 체표를 통해서 수서생물의 체내로 들어오는것

2.4 흡수단계(Uptake phase)

일정농도의 시험물질에 공시생물을 노출시키는 단계

2.5 배출(Depuration)

체내에 들어온 시험물질이 체외로 나가는 것

2.6 배출단계(Depuration phase)

흡수단계가 끝난 후, 공시생물을 시험물질이 없는 물에 옮겨 놓는 단계

2.7 평형상태(Steady state)

시험물질이 체내로 들어오는 양과 배출되는 양이 같게 되는 상태를 말 하며, 이 상태에서 측정한 공시생물 체내의 시험물질 평균농도를 물에서의 평균농도로 나누어 생물농축계수를 구함

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 장치 및 기구

시험에 사용하는 기구나 기기는 시험물질을 흡착하거나, 해로운 물질이 용출되는 재질이어서는 안된다. 수조는 유리로 된 충분한 크기의 것을 사용하고, 사용하는 관(Tubing)은 테프론, 유리, 스테인레스 스틸로 된 것을 사용하고, 플라스틱재질의 관은 최소화한다.

1.2 희석수

공시어의 사육에 적당한 양질의 천연수가 좋으며, 탈염소한 수도수도 사용할 수 있으나, 잔류염소의 농도에 유의하여야 한다. 수질은 시험기간 동안 일정해야 하며 시험 전에 pH, 경도, 알카리도, 고형물질량, TOC 등에 관한 자료를 검토해야 한다. 아울러 3 개월에 1 회씩은 중금속(구리, 납, 아연, 수은, 니켈), 주요 이온(Ca, Mg, Na, K, Cl, SO₄ 등), 농약 등에 관한 분석을 실시하고, 이러한 분석치에 연중 변화가 크지 않으면, 분석간격을 6 개월 또는 1 년으로 늘릴 수 있다. 고형물질(0.45 μm 이상)의 최대허용기준은 5 mg/L이고, TOC는 2 mg/L이다.

1.3 시험용액

시험물질은 희석수에 녹여 사용하며, 물에 잘 녹지 않는 물질은 시험물질 용액 (Stock solution) 조제시, 어류에 대한 독성이 낮은 유기용매와 분산제를 사용할 수 있다.

시험용액은 하루에 적어도 다섯 번 이상 교체되도록 유속을 조절해야 하며, 시험물 질용액과 희석수의 유량은 48 시간 마다 측정하여, 유량의 변화가 20 % 이내에 있도록 한다.

1.4 공시어

시험에 사용하는 어류는 아래의 종중에서 1 종을 선택하여 사용한다. 다른 종을 사용해도 되나, 이 경우는 선정이유를 밝혀야 한다.

어 종	시 험 적 온(℃)	크 기(cm)
잉어(<i>Cyprinus carpio</i> , common carp)	20 ~ 25	5.0 ± 3.0
송사리(<i>Oryzias latipes</i> , ricefish)	20 ~ 25	4.0 ± 1.0

시험에 사용하는 어류는 외형상 이상이 없고 질병이 없는 개체를 사용하며, 질병이 있는 경우는 치료하지 않고 폐기한다. 시험에 사용하는 개체는 크기가 일정한 것을 사용하고, 무게와 나이를 명시해야 하며 순화를 시작한지 48시간 후부터 치사어를 관찰하여 다음의 기준에 따라 처리한다.

- (1) 7 일 안에 치사율이 10 %이상이면 전부를 폐기한다.
- (2) 치사율이 5 % ~ 10 %이면, 7 일간 더 사육한 후 판정한다.
- (3) 치사율이 5 % 이하이면 시험에 사용한다.

1.5 시험조건

- (1) 시험온도의 편차는 ± 2 ℃이내여야 한다.
- (2) 용존산소는 포화농도의 60 % 이상이 유지되어야 한다.
- (3) 흡수단계에서 시험물질의 농도는 20 % 이내에서 유지되어야 한다.
- (4) 공시어의 치사율 또는 이상어의 발생이 10 % 이내여야 한다.

2. 시험방법

2.1 원칙

물고기 체내에서 평형농도에 도달하는 시간은 한 가지 농도의 측정물질을 한 군의 시험물고기에 노출시켜 결정한다. 다음은 시험물질의 농도에 따른 생물농축 정도를 결정하고 마지막으로 체내에서의 배출속도를 측정한다.

2.2 예비사항

2.2.1 시험은 흡수단계와 배출단계로 나누어 한다.

흡수단계는 적어도 시험물질 두 가지 농도 이상의 시험물질과 대조군에서 시험하고, 시험기간은

(1) 연속적으로 다섯 시료에서 일정한 값을 보일 때까지(평형상태) 또는

(2) 28 일간 실시하나, 28 일 안에 평형상태에 도달하지 않으면 시험기간을 연장해야 하는데 최장 60 일을 넘지는 않는다.

2.2.2 흡수단계가 끝나면 배출단계를 시작한다. 만일 생물농축계수가 10 이하이면 배출단계의 시험을 생략할 수 있다.

2.2.3 흡수시험기간, 평형상태에 도달하는 시간은 방정식에 의하여 예측할 수 있다.

2.2.4 생물농축계수는 평형상태일 때 어체 내 시험물질의 평균농도를 수중평균농도로 나누어 구하나 흡수율상수와 배출율 상수의 비율로도 구할 수 있다.

2.2.5 생물농축계수는 어류의 전중(Total wet weight)에 대한 함수로 표현하며 소수성이 높은 물질의 경우($\log P_{ow} > 3$)는 지질함량에 대한 함수로 표현하여 보완할 수 있다.

2.3 노출환경

2.3.1 흡수시험 기간

흡수시험은 원칙적으로 28 일간 노출시키나, 연속적으로 다섯 시료에서 일정한 값을 보이는 평형상태에 이르면 종료시켜도 된다. 28 일 안에 평형상태에 도달하지 않으면 시험기간을 연장해야 하는데, 최장 60 일은 넘기지 않는다. 흡수시험기간은 아래의 방정식에 의하여 예측할 수 있다.

(1) 우선, 배출상수 k_2 (Depuration rate constant, day^{-1})를 다음식에 의해 구할 수 있다.

$$\log_{10}k_2 = -0.414 \log_{10}(P_{ow}) + 1.47(r^2=0.95)$$

(2) 만일, 분배계수(P_{ow})값을 알지 못하면, 시험물질의 용해도(s)를 통하여 구할 수 있다.

$$\log_{10}(P_{ow}) = 0.862 \log_{10}(s) + 0.710(r^2=0.994)$$

$$\therefore s = \text{용해도 (moles/L)}$$

(3) 위에서 구한 k_2 값을 이용하여 아래와 같이 예상흡수시간을 구할 수 있다.

$$t_{80} = 1.6/k_2, \quad t_{80} = \text{평형상태(Steady state)의 80 \%에 도달하는 시간}$$

$$t_{90} = 3.0/k_2, \quad t_{90} = \text{평형상태(Steady state)의 95 \%에 도달하는 시간}$$

(4) 예상흡수기간과 시료채취일정의 예

예상시험기간	4 일 이하	4 일 ~ 14 일	5 일 ~ 21 일	2 1일 이상
시료채취일정	1 시간 6 시간 1 일	4 시간 1 일 3 일	1 일 3 일 7 일	1 일 3 일 7 일
흡수단계	2 일 3 일 4 일	7 일 10 일 12 일 14 일	10 일 14 일 18 일 22 일	10 일 14 일 21 일 28 일
배출단계	1 시간 6 시간 12 시간 1 일	1 일 2 일 4 일 6 일	1 일 3 일 7 일 10 일	1 일 3 일 7 일 14 일

2.3.2 배출시험기간

축적된 물질의 95 %가 배출될 때까지 하는데, 대체로 흡수시험기간의 반이면 충분하므로 14 일을 초과하지 않는다. 그러나 14 일 이내에 95 %가 배출되지 않는 경우는 축적농도의 90 %이상이 배출되면 완료한다.

2.3.3 공시어의 수 및 투여량

1 회 분석시 한 농도당 4 마리를 취한다. 시험용액 대 공시어 투여비율은 하루에 공급하는 물 1 L에 대하여 어류체중 0.1 g ~ 1.0 g의 비율이 추천된다. 적정 투여량은 시험물질의 농도 유지와 용존산소 농도를 감안하여 결정한다.

2.3.4 먹이공급

순화 및 시험기간 동안 시험어류가 건강하게 살 수 있도록 양질의 먹이를 공급한다. 매일 1 회 주며 과잉의 먹이와 배설물은 매일 제거하여 물을 맑은 상태로 유지한다.

2.3.5 광주기와 온도

광주기는 16 시간 조명과 8 시간 어둠으로 하며, 온도는 시험어종에 맞는 온도로 하고 온도편차는 $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 내로 유지한다.

2.3.6 시험농도

적어도 2 농도에서 시험하며, 높은 농도는 급성독성값(96 시간 LC_{50})의 1/10 농도이하 수준이면서 검출한계농도의 10 배 이상은 되어야 한다. 낮은 농도는 높은 농도와 약 10 배의 차이가 있으면서 검출한계보다는 높은 농도에서 시험한다. 시험농도는 원칙적으로 시험물질의 수용성보다 낮아야 하나, 물에 녹이기 어려운 경우에는 유기용매와 분산제를 사용할 수 있으나, 그 농도는 0.1 mL/L 를 초과하지 않아야 하며, 각 수조에 들어가는 양은 같게 한다.

2.3.7 대조군

시험물질 조제시, 유기용매와 분산제를 사용하지 않은 경우는 희석수만 들어있는 대조군을 두나, 유기용매와 분산제를 사용한 경우는 시험농도와 동일한 량의 유기용매와 분산제가 들어 있는 대조군을 둔다.

2.3.8 시험의 시작

노출장치의 구성이 완료되면 적어도 시험시작 48 시간 전에는 가동시켜 시험물질의 농도가 설정농도에 맞도록 하며, 시험물질의 농도를 분석하여 시험조건에 맞는지($\pm 20\%$) 확인하고, 시험농도가 맞지 않으면 시험물질용액, 희석수의 유량을 조절하여 시험조건을 만족시킨 후 시험을 시작해야 한다.

2.4 수질측정 항목 및 빈도

시험기간동안 용존산소농도, pH, 수온은 주 2 회 이상 측정하며, 기타 측정항목은 계속적인 측정치가 있어 수질상태가 일정하게 유지되고 있음을 증명할 수

있으면 생략하나, 계속적인 측정치가 없으면 앞에서 언급한 수질항목에 대한 분석을 하여 회석수로서 적합성을 검토하여야 한다.

2.5 시험물질 분석을 위한 시료채취와 분석

2.5.1 시료채취 일정

시험이 시작되면 어류를 투여하기 전에 시험수를 1 차 채취하고, 이후 1 주일 안에 최소 3 회 이상 시험수와 어류에 대한 시료를 채취하고, 그 다음은 주 1 회씩 시료를 채취한다(흡수단계). 28 일 동안 또는 평형상태에 도달할 때까지 시험을 계속하며, 28 일 안에 평형상태에 이르지 않으면 최장 60 일 동안 시험한다. 앞에서 설명한 이론적 시료채취일정의 예를 참고하여 시험물질의 수용성과 옥탄올/물 분배계수를 이용하여, 95 % 축적이 일어날 수 있는데 소요되는 노출 시간을 계산하여 시행한다. 배출단계에서는 최소 4 회 이상 시험수와 어류에 대한 시료를 채취한다.

배출시험은 흡수된 시험물질의 95 % 이상이 배출될 때까지 하나, 14 일을 초과하지 않는다. 그러나 14 일 이내에 95 % 이상이 배출되지 않는 경우는 축적농도의 90 % 이상이 배출되면 시험을 완료한다.

2.5.2 시료채취 및 조제

먹이를 주기 전에 채취한다. 물 시료는 수조의 가운데서 채취하며 3 반복으로 하고, 많은 양을 채취해야 하는 경우는 각 수조에서 유출되는 것을 취해도 된다. 어류는 한 농도당 최소 4 마리를 잡아내서 깨끗한 물에 씻고, 물기를 제거하고 죽인 후 무게를 단다. 시료채취 후 곧 분석을 해야 하지만, 4 시간 안에 분석을 하지 못하는 경우는 -10 °C 이하에서 보관하거나 추출하여 보관한다.

2.5.3 어류시료의 분석

어류에 축적된 시험물질의 농도는 각 개체별 생체중으로 나타내며, 이것이 어려운 경우는 1 회에 채취한 시료 전체(Pooling)의 생체중으로 나타낼 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 계산법

흡수곡선을 그리고 평형상태에 도달한 것이 확인되면(5 개의 연속되는 점이 시간축과 평형, F검정, $p = 0.05$), 생물농축계수(BCF)를 아래의 식에서 구한다.

$$\text{생물농축계수(BCF)} = \frac{\text{평형상태에서의 어체내 시험물질 평균농도}(C_f)}{\text{평형상태에서의 물에서의 시험물질 평균농도}(C_w)}$$

시험이 종료될 때까지 평형상태에 도달하지 않으면, 최종분석치의 평균값 (어체 및 물)으로 위의 식에 의해 생물농축계수를 계산한다.

생물농축계수는 흡수율상수(k_1)와 배출율상수(k_2)의 비율로 계산할 수 도 있다.

1.2 결과의 해석

시험물질의 분석치가 검출한계와 비슷할 때는 결과를 해석할 때 주의를 해야 한다. 두 시험 농도에서 흡수/배출의 비율이 20 % 이상 차이가 있어서는 안 되며, 만일 있는 경우는 보고서에 언급하고 이유를 설명해야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

- 2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
- 2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속
- 2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간
- 2.4 시험물질 : (1) 화학물질의 명칭(일반명, 상품명 등 명기)
(2) 입수처, 입수일
(3) 순도 또는 불순물
(4) 분자량 및 물리화학적 성질

(5) 기타 필요한 사항

2.5 시험조건 : (1) 시험종 : 학명, 계통명, 입수처, 전처리 유무 및 방법, 순화, 체중 및 체장 등

(2) 시험온도

(3) 노출방법, 조명방법, 광도, 광주기, 광특성

(4) 수조의 수와 크기, 희석수 및 시험물질의 유량 및 교체 횟수, 반복수 시험물질농도, 흡수와 배출단계 기간, 물 및 어체의 시료채취에 대한 사항 등

(5) 시험물질용액 조제방법, 시험농도와 측정농도, 희석수에 대한 사항(처리 및 수질특성), 시험기간 동안의 수질 측정치(pH, 용존산소, 온도 등), 먹이의 종류, 양, 빈도 등에 관한 사항

(6) 분석방법

2.6 시험결과 : (1) 예비시험결과가 있으면 그 결과

(2) 각 수조에서의 치사율 및 이상증상

(3) 측정값 및 농축곡선

(4) 각 시료채취시기별 물과 어체에서의 평균농도

(5) 생물농축계수와 계산방법

(6) 기타 시험과 관련하여 보고해야 할 사항

제10항 토양 내 호기성 및 혐기성 전환 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 토양 중에서 호기성 조건이나 혐기성 조건하에서 다른 형태의 물질로 전환되는 과정을 평가하는데 목적이 있으며, 그 평가내용은 대상시험물질의 전환률과 식물이나 토양유기체 등에 노출될 수도 있는 전환물질의 속성이나 형성되는 속도, 감소비율 등이다.

2. 정의

2.1 시험물질(Test substance)

모 화합물 또는 관련 전환물질 등 모든 물질

2.2 전환물질(Transformation products)

이산화탄소 및 결합잔류물(Bound residues) 내 산물을 포함한 시험 물질의 생물적 또는 비생물적 전환반응에서 생기는 모든 물질

2.3 결합잔류물(Bound residues)

"결합 잔류물"이란 토양, 식물 또는 동물 체내에 결합된 화합물을 나타내며, 추출 후에 모 물질 또는 그 대사물질(들)/전환 물질 형태로 매트릭스 내에 잔존하는 물질

2.4 호기성전환(Aerobic transformation)

산소분자가 존재 시 발생하는 반응

2.5 혐기성전환(Anaerobic transformation)

산소분자 부재 시 발생하는 반응

2.6 무기질화(Mineralisation)

유기 화합물이 호기성 조건에서 CO_2 와 H_2O 로, 혐기성 조건에서 CH_4 , CO_2 와 H_2O 로 완전히 분해되는 현상. 이 가이드라인에서는 ^{14}C 동위원소로 표지된 화합물을 사용하므로 무기질화는 표지된 ^{14}C 원자가 산화되며 적정량의 $^{14}\text{CO}_2$ 를 방출하는 광범위한 분해를 의미한다.

2.6 반감기(Half-life, $t_{0.5}$)

반감기, $t_{0.5}$ 는 토양에서의 전환을 1차 반응속도식(First-order kinetics)으로 설명할 수 있을 때 시험 물질의 50 %가 전환에 이르는 시간이며, 초기농도와는 무관.

2.7 50 %, 75 %, 90 % 소멸시간($\text{DT}(\text{Disappearance Time})_{50}$, DT_{75} , DT_{90})

시험 물질 농도가 초기농도와 비교하여 50 %, 75 %, 90 % 줄어드는데 소요되는 시간.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법 적용성

이 방법은 모든 화학물질(비표지 또는 방사성표지)에 적용 가능하며, 약한 휘발성, 비휘발성, 수용성 또는 비수용성 화합물에도 적용가능하다. 그러나 토양으로부터 휘발이 강한 화학물질(예, 훈증제, 유기 용제) 등은 적용이 불가하다.

1.2 시험물질 정보

^{14}C -표지화합물을 권장하지만 ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P 와 같은 다른 동위원소 물질도 사용 가능. 시험 물질 순도는 95 % 이상이어야 함.

토양 내 호기성 및 혐기성 전환에 관한 시험 실시 전에, 시험 물질에 대한 다음과 같은 정보의 확보가 필요.

- 1) 수용성
- 2) 유기용매에서의 용해도

- 3) 증기압 및 헨리(Henry) 상수
- 4) n-옥탄올/물 분배계수
- 5) 암조건에서의 안정성(가수분해)
- 6) 해리성 물질의 경우 해리상수(pKa) 값

1.3 시험토양

1.3.1 토양 선택

1.3.1.1 전환경로(Transformation pathway) 확인을 위한 시험의 경우 pH 5.5 ~ 8.0의 사양토(Sandy loam)이나 미사질 양토(Silty loam), 양토(Loam), 양질사토(Loamy sand) [FAO와 USDA 분류를 따름 ¹⁾] 토양을 사용, 유기탄소 양은 0.5 %¹⁾ ~ 2.5 %, 미생물 총량은 총 유기탄소의 최소 1 % 정도의 토양을 권장.

1.3.1.2 전환율(Transformation rate) 시험의 경우 추가로 토성이 다른 3종의 대표적 토양에서 시험을 수행하며, 유기탄소함량, pH, 점토 함량 및 미생물 총량이 다른 토양 선택.

1.3.1.3 시험 토양에 대해서는 토성(모래 %, 실트 %, 점토 %), pH, 양이온치환능력, 유기탄소, 겉보기밀도(Bulk density), 보습성(표 1 참조) 및 미생물 총량(호기성연구 전용) 등 토양의 특성을 규명. 미생물 총량은 기질-유도호흡(Substrate-induced respiration, SIR) 법이나 대체 방법을 사용하여 측정.

1.3.2 토양 수집, 취급 및 저장

1.3.2.1 토양시료 채취 현장에 대한 정보를 기재함. 즉 시료채취 지역의 정확한 위치, 작물 식재(Vegetation cover), 화학물질 처리 상황, 유기 및 무기 화학비료 처리, 생물재(Biological materials) 또는 기타 오염물질 등에 대한 정보를 기재. 지난 4 년간 시험 물질이나 그와 구조적으로 유사한 물질이 처리된 적이 있다면 그 토양은 사용해서는 안된다.

1.3.2.2 토양시료의 채취는 체질이 쉽도록 일정량의 토양수분 함량이 있는 토양을 채취한다(지표(a horizon) 또는 표토 20 cm 층). 논토양 이외의 다른 토양은 장기

1) Soil Texture Classification (US and FAO systems): Weed Science, 33, Suppl. 1 (1985) and Soil Sci. Soc. Amer. Proc. 26:305 (1962)

간(> 30 일) 가뭄이나 결빙, 홍수 기간 중 직후는 시료 채취를 피해야 한다. 채취한 토양시료는 토양수분 함량 변화를 최소화하는 방법으로 이송해야 하고, 통풍이 잘 되는 암조건에 보관한다.

1.3.2.3 토양시료는 채취한 가능한 빠른 시간 내에 채질한다. 작은 돌, 식물 잔해 등은 2 mm 체에 거르기 전에 제거한다.

1.3.2.4 채취한 시료를 보관해서 사용하는 경우 토양 중 미생물의 활성을 유지하기 위하여 최대 3 개월 이내, $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건에서 보관해서 사용하는 것이 좋다.

1.3.2.5 준비된 토양은 시험에 사용하기 전에 시험에 영향을 줄 수 있는 종자 등을 제거하고, 미생물 대사가 정상적으로 될 수 있도록 시험전 사전 배양을 수행한다. 실제 시험의 온도 및 수분 조건에서 2 일에서 28 일 간 사전 배양하는 것이 적절하다. 시료보관 및 사전 배양 시간은 합쳐서 3 개월을 넘어서는 안된다. (최근 조사 결과에 따르면 온대 지역 토양은 눈에 띄는 미생물 활성 소실 없이 -20°C 에서 3 개월 이상 저장도 가능)

2. 품질기준(Quality Criteria)

2.1 회수율

회수율은 표지 화합물은 90 % ~ 110 %, 비표지 화합물은 70 % ~ 110 % 범위여야 함.

2.2 검출한계

시험 물질 및 전환물질의 분석법 검출한계(LOD)는 최소 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 또는 처리량의 1 % 이하여야 함. 정량한계를 제시해야 함

3. 시험방법

3.1 시험조건

3.1.1 시험 온도

전 시험동안 시험토양은 일정한 온도 (시험물질 사용 및 배출이 주로 일어나는 기후를 대표하는 온도) 및 암조건 하에서 배양하며, 온도는 $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 조건을 권장. 온도는 반드시 모니터링 되어야 함

추운 기후에서 화학물질이 적용되거나 배출되는 경우 (예, 가을, 겨울 기간), 추가 시료가 낮은 온도(예 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$)에서 배양되어야함

3.1.2 수분 함량

호기성 조건 하의 시험에서는 토양 수분 함량(pF)²⁾(표 2 참조)는 2.0 ~ 2.5로 유지함. 혐기성 및 논토양 조건에서는 물포화 상태이므로 토양수분 함량 조정이 필요하지 않음.

3.1.3 호기성 배양 조건

공기흐름식(Flow-through) 시스템 내에서는 간헐적 수세방식이나 지속적으로 가습공기를 공급하면서 호기성 조건을 유지. 생체(이산화탄소) 측정기(Biometer) 플라스크 사용시에는 확산에 의한 공기 교환으로 호기성 조건 유지.

3.1.4 멸균 호기성 조건

멸균한 시험물질(멸균 필터 통과)을 멸균 토양에 처리하고 3.1.3. 방법으로 가습 멸균 공기로 통기함. 논토양의 경우, 토양과 물을 멸균하고 3.1.6.의 방법으로 배양함.

3.1.5 혐기성 배양 조건

혐기성 조건을 유지하기 위해서 시험물질이 처리된 시험토양을 1 cm ~ 3 cm의 물층을 유지하면서 30 일 또는 반감기나 DT_{50} 기간 동안 배양. 이 배양 시스템에 비활성 기체(예, 질소 또는 아르곤)를 지속적으로 주입하고, pH, 산소 농도 및 산화환원 전위를 측정함. 또한 휘발성 물질 포집을 위한 포집장치를 시험 시스템에 부착함. 생체(이산화탄소) 측정기(Biometer) 형태의 시스템은 확산에 의한 공기 유입을 차단함.

3.1.6 논토양 배양 조건

시험토양은 약 1 cm ~ 5 cm 물로 담수시킨 후 시험물질은 물층에 처리함. 토양 깊이는 최소 5 cm 이상이 적합하며, 배양시스템에 호기조건 상태의 공기를 통풍시킴. 물층에서의 pH, 산소 농도 및 산화환원 전위를 측정하고, 혐을 수행하기 전 사전 배양은 최소 2 주 이상 필요함.

2) 물기둥 100 cm = 3 pF = 1 bar = 100 kPa

3.1.7 시험 기간

전환비율 및 경로 연구는 120 일 경과시에는 토양 미생물 활성 감소가 예상되므로 보통 120 일을 초과해서는 안됨. 시험 물질 감소와 주요 전환 산물 형성 및 감소 등에 정보가 필요할 경우 기간을 연장하여(예, 6 개월 또는 12 개월) 연구를 계속할 수 있으며, 시험 기간 중과 시험 종료 시점에서 생물중량을 측정하여 제시해야 함.

3.2 시험 물질 처리

3.2.1 각 배양 플라스크에 시험 물질을 처리한 토양 약 50 g ~ 200 g(건중량 기준)

을 넣는다. 시험물질 처리시 유기용매를 사용할 경우 토양으로부터 유기용매를 완전히 제거하고 스파툴라(Spatula)를 사용하거나 플라스크를 흔들어서 토양을 완전히 혼합한다. 논토양 조건에서 연구를 시행하는 경우, 시험 물질 처리 후 토양과 물을 완전히 혼합해야 한다. 처리 토양 1 g 정도를 채취하여 시험물질의 균질성 분석에 사용한다.

3.2.2 시험물질 처리 비율은 사용자 지침서에서 권장한 작물 보호를 위한 최고 처리량에 상응하는 양을 처리하고, 포장에 처리하는 깊이(표토 10 cm 정도)와 유사한 깊이로 시험물질을 처리한다.

3.2.3 또 다른 방법으로는 1 kg ~ 2 kg의 토양을 배치(Batch)로 하여 시험물질을 처리한 후 적절한 혼합기로 혼합하고 200 g 정도의 소량을 배양 플라스크로 옮긴다. 이 중에서 토양 1 g 정도를 채취하여 시험물질의 균질성 분석에 사용한다. 이와 같은 방법은 시험물질을 토양에 좀 더 균질하게 처리 할 수 있어 권장되는 방법이다.

3.2.4 시험물질을 처리하지 않은 토양시료를 시험물질이 처리된 토양시료와 동일한 조건(호기성)에서 배양한다. 이 시료는 시험 중간 및 시험 종료 전 미생물량 측정에 사용된다.

3.2.5 시험물질을 유기용매에 녹여 토양에 처리할 경우 같은 유기용매량으로 처리된 토양시료(시험물질 미처리)를 시험물질이 처리된 토양시료와 동일한 조건(호기성)

에서 배양한다. 이 시료는 유기용매가 미생물 총량에 미치는 영향을 보기 위한 것으로 시험 중간 및 시험 종료 전 미생물량 측정에 사용된다.

3.2.6 시험물질을 처리한 토양시료는 그림 1의 공기흐름 시스템에서 시험하거나 그림 2의 흡수 컬럼이 부착된 밀폐된 시스템에서 시험을 수행한다.

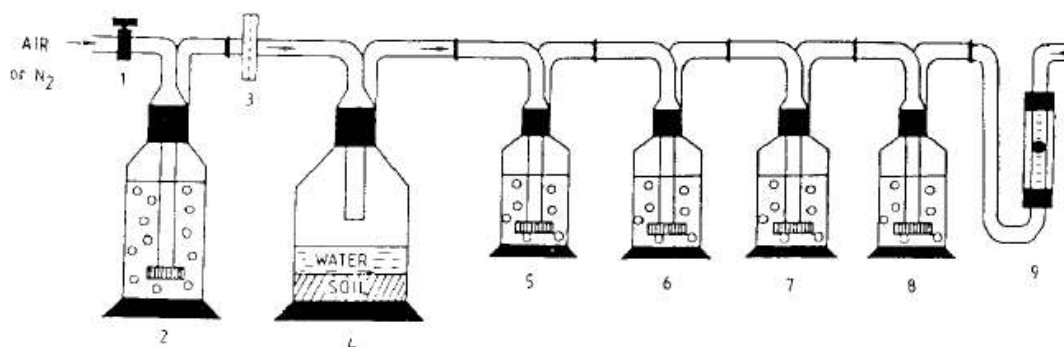


그림 1. 공기흐름식 시스템

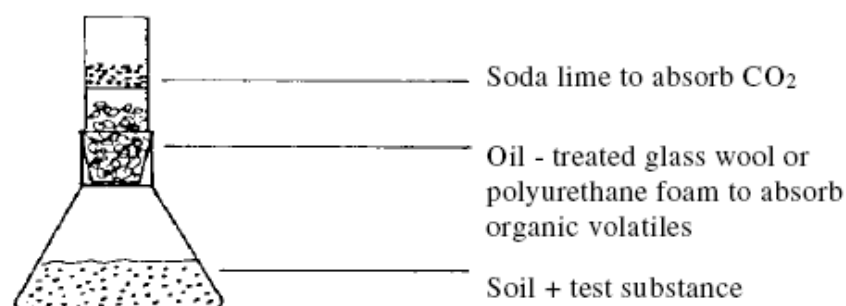


그림 2. 생체(이산화탄소) 측정기-플라스크 시스템

3.3 시료채취 및 농도측정

3.3.1 2 개의 배양 플라스크를 적절한 시간 간격으로 채취하고, 채취한 토양시료는 다른 극성을 가진 적합한 유기용매로 추출한 후 시험물질 또는 전환물질을 분석한다. 또한, 휘발성 물질을 분석하기 위하여 시험기간 중과 종료 시점에서 각 토양시료 배양 플라스크에 부착된 포집용액이나 고체 포집물질을 다양한 시간 간격(첫 달 동안 7 일 간격 그리고 한 달 후 14 일 간격)으로 채취하여 분석한다. 시험물질 처리 후 바로 채취한 토양 시료(0-일 시료)를 제외하고 최소한 5 지점에

서 시료 채취가 이루어져야 한다. 시료 채취 간격은 시험 물질 감소 패턴과 전환 산물의 형성 및 감소 패턴을 확인 할 수 있는 시간(예, 0 일, 1 일, 3 일, 7 일; 2 주, 3 주; 1 개월, 2 개월, 3 개월 등)으로 결정해야 한다.

3.3.2 ^{14}C -표지 시험 물질을 사용할 경우, 비추출 방사능 물질은 연소시켜 정량해야 하며, 각 시료 채취 시간별 물질수지(Mass-balance)를 계산해야 한다.

3.3.3 혐기성 및 논토양 시험의 경우, 토양과 물층을 합하여 시험물질과 전환물질을 분석하거나 또는 추출 및 분석 전에 물층과 토양을 여과나 원심분리를 통하여 분리하여 각각에 대해 시험물질과 전환물질을 분석한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 시험물질, 전환물질, 휘발성 물질(%로만) 및 비추출량은 시험물질을 처리한 초기량의 %로 표시하고, 각 시료 채취 시간별로 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 토양(토양 건 중량 기반)으로 표시한다. 물질수지(Mass balance)는 각 시료채취 시간별로 초기 처리 농도에 대한 %로 표시한다. 주요 전환물질에 대해서는 반드시 규명(Identification) 해야 하며 전환물질의 농도도 시간별로 형성되는 양과 소멸되는 양에 대해 도식화해야 한다. 주요 전환물질은 시험기간 중 처리 농도의 $\geq 10\%$ 검출된 물질을 말한다.

1.2 전환율에 관한 시험이 여러 온도에서 실시되는 경우, 전환율은 아레니우스(Arrhenius) 식에 의해 실험 온도 범위 내에서 온도 함수로 기술되어야 한다.

$$k = A \cdot e^{-B/T} \text{ or } \ln k = \ln A - \frac{B}{T},$$

$\ln A$ 와 B 는 $1/T$ 에 대한 $\ln k$ 의 선형회귀식으로 계산된 절편과 기울기로부터의 회귀상수이며, k 는 온도 T 에서의 속도 상수, T 는 켈빈(Kelvin) 온도이다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험수행기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질 :

- 1) 일반명, 화학물질명, CAS 번호, 구조식(방사성표지 물질 사용 시 표지 위치 표시) 및 관련 물리화학적 성질
- 2) 시험 물질 순도, 불순물 함량
- 3) 동위원소 표지 화합물의 방사화학적 순도 및 특정활성도(Specific activity)
- 4) 참조 물질의 화학물질명 및 구조 (사용할 경우)

2.5 시험 토양 :

- 1) 토양채취 장소 명세
- 2) 토양시료 채취 일자 및 방법
- 3) pH, 유기탄소함량, 토성(모래 %, 실트 %, 점토 %), 양이온치환용량, 밀도, 수분 보유 특성 및 미생물량
- 4) 토양 저장 기간 및 저장 조건 (저장시)

2.6 시험조건 :

- 1) 시험 실시 일자
- 2) 처리한 시험 물질량
- 3) 사용한 유기용매 및 시험 물질에 처리한 방법
- 4) 최초 처리 토양 및 분석을 위해 각 시간별로 채취한 토양시료의 무게
- 5) 사용한 배양 시스템 기술
- 6) 공기 흐름식(Flow-through) 시스템
- 7) 실험 온도
- 8) 배양 중 토양 수분 함량
- 9) 호기성 시험시 초기, 중기, 말기의 미생물량
- 10) 혐기성 및 논토양 시험시 초기, 중기, 말기의 pH, 산소 농도 및 산화환원 전위
- 11) 추출 방법
- 12) 토양 중 시험물질 및 전환물질과 포집물질의 정량 및 동정방법
- 13) 시료 반복수와 대조시료 수

2.7 시험결과 :

- 1) 미생물 활성 측정 결과
- 2) 사용한 분석법 재현성 및 민감성
- 3) 회수율
- 4) 초기 처리 농도의 %나 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 토양(건중량 근거)으로 계산한 결과표
- 5) 시험기간 중과 종료시점에서의 물질수지(Mass balance)
- 6) 토양 중 비추출성(결합) 방사능 또는 잔류물 특성 규명
- 7) 이산화탄소 및 휘발성 물질 정량화
- 8) 시험물질 및 주요 전환물질에 대한 시간 대비 토양 농도 그래프
- 9) 신뢰한계를 포함한 시험물질 및 주요 전환물질의 반감기 또는 DT_{50} , DT_{75} 및 DT_{90}
- 10) 멸균 조건에서 비생물적 분해율 예측
- 11) 시험물질 및 주요 전환물질의 전환 역학 평가
- 12) 전환경로 제안
- 13) 토의 및 결과해석
- 14) 측정값(Raw data)

표 1. 수분장력, 지면 수용력(FC) 그리고 용수량(WHC)

water column의 높이(cm)	pF ^(a)	bar ^(b)	주의
10^7	7	10^4	건조토양
$1.6 \cdot 10^4$	4.2	16	위조점(Wilting point)
10^4	4	10	
10^3	3	1	
$6 \cdot 10^2$	2.8	0.6	
$3.3 \cdot 10^2$	2.5	0.33 ^(e)	지면수용력 ^(d) 의 범위
10^2	2	0.1	
60	1.8	0.06	
33	1.5	0.033	
10	1	0.01	WHC(근사값)
1	0	0.001	수분에 포화된 토양

(a) pF = water column cm의 log값

(b) 1bar = 10^5 Pa.

(c) 모래에 10%, 양토에 35%, 점토에 45% 포함된 수분의 값과 대략적으로 일치한다.

(d) 지면용수력은 일정하지 않고 토양 유형에 따라서 pF 1.5와 2.5사이의 값을 갖는다.

수분장력 : Water column의 cm 또는 Bar로 측정한다. 흡입장력의 범위가 넓기 때문에 Water column의 cm 값을 로그화한 pF value로 간단하게 표시한다.

지면 수용력(FC) : 충분한 물을 급수하거나 2 일간 비가 온 후 중력에 저항하며 토양에 저장되어지는 물의 총량으로 정의한다. 이것은 지면의 원래 장소에서 평정한 상태에 있는 토양에서 측정해야 한다. 그러므로 실험실의 교란된 토양표본에서는 적용할 수 없다. 교란된 토양이 높은 계통적 다양성을 보일 때 FC 값을 결정할 수 있다.

용수량(WHC) : 실험실에서 교란된 토양과 교란되지 않은 토양으로 Column을 만들어 모세관 이동으로 물을 스며들게 하여 결정한다. 지면 수용력보다 30 %이상 높은 값이 나오며 특히 교란된 토양에서 유용하다. 이것은 또한 신뢰적인 FC 값보다 실험으로 쉽게 결정할 수 있다.

표 2. 여러나라의 다양한 토양유형별 수분 함량(건조 토양 100 g당 물의 g)

토양유형	국가	토양 수분 함유		
		WHC ¹	pF=1.8	pF=2.5
모래	독일	28.7	8.8	3.9
양질사토(Loamy sand)	독일	50.4	17.9	12.1
양질사토	스위스	44.0	35.3	9.2
미사질 양토(Silt loam)	스위스	72.8	56.6	28.4
점질 양토(Clay loam)	브라질	69.7	38.4	27.3
점질 양토	일본	74.4	57.8	31.4
사양토(Sandy loam)	일본	82.4	59.2	36.0
미사질 양토	미국	47.2	33.2	18.8
사양토	미국	40.4	25.2	13.3

¹ 용수량

제11항 수중 퇴적물에서의 호기성 및 혐기성 전환시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 퇴적물 내의 호기성 또는 혐기성 조건 하에서 다른 형태의 물질로 전환되는 과정을 평가하는데 목적이 있으며, 그 평가내용은 대상시험 물질의 전환률과 수계환경에 노출될 가능성이 있는 전환물질의 속성이나 형성되는 속도, 감소비율 등이다.

2. 정의

2.1 시험물질(Test substance)

모 화합물(parent) 또는 관련 전환물질 등 모든 물질

2.2 전환물질(Transformation products)

이산화탄소 및 결합잔류물(Bound residues) 내 산물을 포함한 시험 물질의 생물적 또는 비생물적 변환 반응에서 생기는 모든 물질

2.3 결합잔류물(Bound residues)

토양, 식물 또는 동물 체내에 결합된 화합물을 나타내며, 추출 후에 모 물질 또는 그 대사물질(들)/전환 물질 형태로 매트릭스 내에 잔존하는 물질

2.4 호기성전환(Aerobic transformation)

산소분자가 존재 시 발생하는 반응

2.5 혐기성전환(Anaerobic transformation)

산소분자 부재 시 발생하는 반응

2.6 천연수(Natural water)

호수, 강, 하천 등의 표층수

2.7 퇴적물(Sediment)

무기질 및 유기 화학적 성분의 혼합물이며, 후자는 탄소와 질소 고함량 및 고분자량을 가진 화합물을 함유하고 있음. 퇴적물은 천연수에 의해 퇴적되고 그 천연수와 계면(Interface)을 형성

2.8 무기질화(Mineralisation)

유기 화합물이 호기성 조건에서 CO_2 와 H_2O 로, 혐기성 조건에서 CH_4 , CO_2 와 H_2O 로 완전히 분해되는 현상. 이 가이드라인에서는 ^{14}C 동위원소로 표시된 화합물을 사용하므로 무기질화는 표시된 ^{14}C 원자가 산화되며 적정량의 $^{14}\text{CO}_2$ 를 방출하는 광범위한 분해를 의미한다.

2.9 반감기(Half-life, $t_{0.5}$)

반감기, $t_{0.5}$ 는 토양에서의 전환을 1차 반응속도식(First-order kinetics)으로 설명할 수 있을 때 시험 물질의 50 %가 전환에 이르는 시간이며, 초기농도와는 무관.

2.10 50 %, 75 %, 90 % 소멸시간(DT(Disappearance Time)₅₀, DT₇₅, DT₉₀)

시험 물질 농도가 초기농도와 비교하여 50 %, 75 %, 90 % 줄어드는데 소요되는 시간.

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법 적용성

1.1.1 이 방법은 모든 화학물질(비표지 또는 방사성표지)에 적용 가능하며, 약한 휘발성, 비휘발성, 수용성 또는 비수용성 화합물에도 적용가능하다. 그러나 토양으로부터 휘발이 강한 화학물질(예, 훈증제, 유기 용제) 등은 적용이 불가하다.

1.1.2 이 방법은 담수와 퇴적물 내에서 화학물질 전환 연구에 적용 가능하고, 강 하구/해양 시스템에도 적용 가능하나 흐르는 물(강과 같은)이나 바다와 유사한 조건에서는 적용이 불가하다.

1.2 시험물질 정보

^{14}C -표지화합물을 권장하지만 ^{13}C , ^{15}N , ^3H , ^{32}P 와 같은 다른 동위원소 물질도 사용 가능하며 시험물질의 화학적/방사화학적 순도는 95 % 이상이어야 한다.

퇴적물 내 호기성 및 혐기성 전환에 관한 시험 실시 전에, 시험 물질에 대한 다음과 같은 정보의 확보가 필요하다.

- 1) 수용성
- 2) 유기용매에서의 용해도
- 3) 증기압 및 헨리(Henry) 상수
- 4) n-옥탄올/물 분배계수
- 5) 흡착계수(K_d , K_f 또는 K_{oc})
- 6) 가수분해
- 7) 해리상수(pK_a)
- 8) 시험물질의 화학적 구조, 동위원소 표지 위치

1.3 시험용 수중 퇴적물

1.3.1 퇴적물 선택

1.3.1.1 호기성 시험용으로 두 종류의 퇴적물을 선택한다. 선택된 퇴적물 2 종은 유기 탄소 함량과 구성면에서 달라야 한다. 하나는 퇴적물은 유기탄소 고함량(2.5 % ~ 7.5 %)에 세립질(Fine texture)이어야 하며, 다른 하나는 유기탄소 저함량(0.5 % ~ 2.5 %)에 조립질(Coarse texture)이어야 한다. 두 퇴적물간 유기탄소 함량 차이는 일반적으로 최소 2 % 이내이다. “세립질”은 [점토(Clay)+미사(Silt)] 함량이 > 50 %이며 “조립질”은 [점토+미사] 함량이 < 50 %인 경우로 정의한다. 두 퇴적물간 [점토+미사] 함량 차이는 일반적으로 최소 20 %다. 대상 시험물질이 해양까지 도달할 가능성이 있다면 적어도 한 종은 해양 부근의 퇴적물을 선택해야 한다.

1.3.1.2 정확한 혐기성 시험을 위해서는, 두 종의 퇴적물 (물 포함)는 표층수의 혐기성 구역에서 채취하여야 한다. 퇴적물과 함께 채취한 물 시료 모두 혐기 조건 하에서 이송해야 한다.

1.3.2 물-퇴적물 시료의 특성

1.3.2.1 물과 퇴적물의 주요 요소들은 반드시 측정하고 기록해야 한다.

1.3.2.2 그 외에, 다른 변수들은 필요시 측정하여 기록한다. 예를 들어 담수의 경우

입자, 알칼리도, 경도, 전기전도도, NO₃/PO₄ (비율 및 개별 값) 등을, 퇴적물의 경우 양이온 치환 능력, 수분함량(Water holding capacity), 탄산염(Carbonate), 총 질소 및 총인, 해수의 경우 염도 등을 필요시 측정, 기록한다.

표. 물-퇴적물 시료 특성 규명을 위한 변수 측정

변수	시험 과정 단계					
	현장 표본추출	사후 처리	순용 시작	시험 시작	시험 중	시험 종료
물						
출처	○					
온도	○					
pH	○		○	○	○	○
TOC			○	○		○
산소 농도	○		○	○	○	○
산화환원 전위			○	○	○	○
퇴적물						
출처	○					
층 깊이	○					
pH		○	○	○	○	○
입도 분포		○				
TOC		○	○	○		○
미생물체량 ^{주1)}		○		○		○
산화환원 전위	관찰(색깔 /냄새)		○	○	○	○

1.3.3 수집, 취급 및 저장

1.3.3.1 수집 : 퇴적물 시료는 퇴적물 상층 5 cm ~ 10 cm부위에서 채취해야 한다. 함께 채취되는 물은 퇴적물과 같은 장소나 위치에서 동시에 수집한다. 혐기성 시험을 위해서는 퇴적물과 함께 채취한 물 시료 모두 무산소 조건 하에서 이송해야 한다.

1.3.3.2 처리 : 퇴적물은 물로부터 여과하여 분리하고 분리한 퇴적물은 과량의 시료채취지점의 물을 사용하여 2 mm 체에 습식 체질 후, 물은 폐기한다. 기지의

퇴적물과 물을 배양플라스크에 원하는 비율로 혼합하여 순응시킨다. 혐기성 시험의 경우 모든 처리단계는 산소가 배제된 상태에서 진행한다.

1.3.3.3 저장 : 바로 채취한 퇴적물과 물을 시험에 사용하는 것을 권장하지만 저장이 필요할 경우 1.3.3.2와 같이 퇴적물과 물을 체로 걸러서 $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 의 암조건에서 물로 채운 후(6 cm ~ 10 cm 수층) 최대 4주간 저장하며 사용한다. 호기성 시험에 사용할 시료는 공기가 잘 통하게 보관하고(뚜껑 없는 용기 사용), 혐기성 시험에 사용할 시료는 산소가 배제되게 보관한다. 퇴적물과 물은 이송 및 저장 중에 얼거나 건조되어서는 안된다.

1.4 시험용 퇴적물/물 시료 준비

순응기간은 각 퇴적물/물 시료를 본 시험에 사용할 배양 용기에 담아서, 시험물질을 첨가하지 않고 수행한다. 순응은 시험시와 완전히 동일한 조건에서 수행한다. 순응기간은 일반적으로 1 주 ~ 2주 간 수행하며 4 주를 초과해서는 안된다.

2. 품질기준(Quality criteria)

2.1. 회수율

회수율은 표지 화합물은 90 % ~ 110 %, 비표지 화합물은 70 % ~ 110 % 범위여야 한다.

2.2. 검출한계

시험 물질 및 전환물질의 분석법 검출한계(LOD)는 최소 $0.01\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 또는 초기 처리량의 1 % 이하여야 하며, 정량한계(LOQ)도 구해야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험조건

3.1.1 시험은 배양장치에 물 : 퇴적물 비율을 3 : 1과 4 : 1 사이로 하고 퇴적물 층을 $2.5\text{ cm} (\pm 0.5\text{ cm})$ 로 하여 수행한다. 배양용기 당 최소 50 g의 퇴적물 (건중량 기준) 사용을 권장한다.

3.1.2 시험은 $10\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 온도범위의 암조건에서 수행한다. 온도는 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 적합하다. 배양온도는 반드시 측정하고 기록한다.

3.2. 시험 물질 처리

3.2.1 일반적으로 시험물질 한 농도를 사용하여 시험하나, 필요한 경우 두 번째 처리농도를 추가하여 시험할 수 있다. 작물 보호용 화학물질은 수표면에 직접 처리하므로 표지 상 최대 처리량은 시험 용기 속 물 표면적을 기반으로 계산된 최대 처리율로 간주한다. 모든 경우에 있어서 처리 농도는 예측 가능한 환경 노출량을 기반으로 선정한다. 시험물질 처리농도가 초기부터 검출 한계에 가깝거나 또는 주요 전환물질이 시험물질 처리량의 10 %에서도 검출이 불가능 할 경우 처리량을 높일 필요가 있다(예, 10 배). 그러나 더 높은 시험 농도를 사용한다면 그 농도가 물-퇴적물 내 미생물 활성화에 역효과를 미쳐서는 안된다. 시험용기에 따른 처리용량의 계산 예는 (주 2)을 참조한다.

3.2.2 시험물질 처리시 가장 좋은 방법은 시험물질을 물에 녹여 처리하는 것이다. 시험물질이 물에 용해가 잘 안되면 소량의 수용성 용매(아세톤, 에탄올 등)를 사용하는 것은 가능하다. 용매의 양은 1 % v/v를 초과해서는 안되며 미생물의 활성화에 영향을 주어서는 안된다.

3.2.3 제제(Formulation) 형태의 시험물질 처리는 일반적으로 사용하지 않는 것이 좋다. 제제된 시험물질은 물층과 퇴적물 상에서 시험물질 혹은 전환물질의 분산에 영향을 줄 수 있기 때문이다. 그러나 물에 거의 녹지 않는 시험물질의 경우 대체 방법으로 제제된 시험물질을 사용하는 것이 적절하다.

3.2.4 배양 용기의 수는 시료채취 횟수에 따라 다를 수 있다. 충분히 많은 수의 배양 용기를 준비한다. 각 시료 채취 시기마다 퇴적물의 미생물량(Biomass)과 물과 퇴적물의 TOC 측정을 위해 시험물질이 처리되지 않은 대조구 시료가 필요하며, 또한 순응기간 중 퇴적물과 물에 대해 요구되는 인자들을 측정하기 위한 2 개의 대조구 시료가 필요하며, 추가로 시험물질 처리시 유기용매를 사용한 경우 미생물의 활성화에 영향을 주는지 확인할 수 있는 대조시료가 필요하다.

3.3 시험 기간 및 시료 채취

3.3.1 시험 기간은 일반적으로 100 일을 넘어서는 안 되며, 분해 경로와 물/퇴적물의 분배 경향이 확정될 때까지 혹은 시험물질의 90 %가 전환되거나 휘발로 소실될 때까지 시험이 진행되어야 한다. 시료 채취 횟수는 최소 6 회 이상(0 시간 포함)이어야 하고, 이전 시험에서 시험물질에 대한 활용가능 자료가 충분하지 않다면,

적절한 시료채취 방식과 시험기간 결정을 위한 조건 부적 예비시험을 수행한다. 소수성 시험 물질의 경우, 시험초기 단계에서 물층과 퇴적물 층 사이의 분산율을 측정하기 위해 추가적인 시료 채취가 필요할 수 있다.

3.3.2 시료를 채취한 후 분석을 위해 모든 배양 용기를 제거한다. 퇴적물과 상층부의 물은 각각 분리하여 분석한다. 표층수는 퇴적물의 교란을 최소화하면서 조심스럽게 제거한다. 시험물질과 전환물질의 추출 및 정량 등은 적절한 분석법에 따라 수행한다.

3.4 조건부적 예비 시험

시험기간 및 시료 채취 방식 등이 시험물질과 관련된 다른 연구로부터 예측이 불가능하면 조건부적 예비시험을 수행하는 것이 적절하다. 예비시험은 본시험을 수행하기 위해 설정된 시험조건과 동일하게 수행하며, 그 결과를 간략하게 보고서 형태로 작성한다.

3.5 측정 및 분석

3.5.1 모든 물과 퇴적물의 시료채취 시기마다 시험물질과 전환물질의 농도를 측정하여 보고해야 한다(처리량에 대한 농도와 백분율). 일반적으로 전환물질은 시료채취시마다 총 물/퇴적물 시스템에 처리된 방사능의 10 % 이상 검출되는 경우 규명(Identification) 해야 한다. 시험 기간 중 지속적으로 농도가 증가하는 경향을 보이는 전환물질의 경우는 10 % 이상 검출되지 않아도 규명과정이 수행되어야 한다. 이와 같은 전환물질은 잔류될 가능성이 높기 때문이다.

3.5.2 각 시료 채취시기마다 측정된 가스/휘발성 물질 포집시스템(이산화탄소 및 휘발성 유기 화합물)에 대한 결과는 제시되어야 하고, 무기질화 비율에 대한 결과도 제시해야 한다. 시료 채취 시기마다의 퇴적물 내의 비추출(결합) 잔류물에 대한 측정 결과도 제시해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 계산

1.1 처리한 방사능의 총 물질수지(Mass balance) 또는 회수율은 모든 시료 채취시기마다 계산되어야 한다. 결과는 처리한 방사능량에 대한 백분율로 보고한다. 물과 퇴적물 사이의 방사능 분포 량도 각 시료 채취시기마다 농도와 백분율로 보고해야 한다.

1.2 시험물질의 반감기, DT_{50} , DT_{75} , DT_{90} 는 신뢰한계와 함께 계산해서 제시해야 한다.

2. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음과 같은 사항을 기재한다.

2.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

2.4 시험물질

1) 일반명, 화학물질명, CAS 번호, 구조식(방사성표지 물질 사용 시 표지 위치 표시) 및 관련 물리화학적 성질

2) 시험 물질 순도, 불순물 함량

3) 동위원소 표지 화합물의 방사화학적 순도 및 특정활성도(Specific activity)

4) 참조 물질의 화학물질명 및 구조 (사용할 경우)

2.5 시험 퇴적물과 물

1) 장소, 수중 퇴적물 채취 지역에 대한 기술, 오염 역사(가능시)

2) 물/퇴적물 시스템의 수집, 저장 및 순응과 관련된 모든 정보

3) 물/퇴적물 시료의 특성

2.6 시험조건

1) 사용한 시험 시스템(공기흐름식, 생체(이산화탄소) 측정기, 통풍 방법, 교반 방법, 물 용량(Water volume), 퇴적물 질량, 물/퇴적물 층 두께, 시험 용기 크기 등).

2) 시험물질 처리 : 처리한 시험물질 농도, 반복 수, 시험물질 처리 방법 등

3) 배양 온도

- 4) 시료채취 시간
- 5) 추출방법 및 효율, 분석방법과 검출한계
- 6) 전환물질 특성/동정 방법
- 7) 시험기간 중 시험계획서 또는 시험조건의 이탈 내용

2.7. 시험결과 :

- 1) 대표적인 분석관련 측정값(Raw data) 그림(모든 Raw data는 GLP 자료보관실에 보관되어야 함)
- 2) 사용한 분석방법의 재현성, 감도
- 3) 회수율
- 4) 시험물질 초기 처리량에 대해 %와 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 로 표현한 결과 표 : 물과 퇴적물, 전체 시스템(% 로만), 가능하다면 전환물질과 비추출 방사능물질 포함
- 5) 시험기간 중 및 종료 시점에서의 물질수지(Mass balance)
- 6) 물과 퇴적물 분획 및 전체 시스템(무기질화 포함)에서의 전환에 대한 그래픽 표시
- 7) 무기질화 비율
- 8) 시험 물질 및 적절한 경우, 물, 퇴적물 및 전체 시스템 내 신뢰 한계를 포함한 전환물질의 반감기 또는 DT_{50} , DT_{75} 및 DT_{90}
- 9) 시험물질과 적절한 경우, 전환물질의 전환 kinetics 평가
- 10) 적절한 경우, 전환 경로 제안
- 11) 결과 논의

주1) ISO-14240-2. (1997). Soil quality - Determination of soil microbial biomass - Part 2: Fumigation-extraction method

주2) OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, No 308 ANNEX 5.

제12항 지표수의 호기성분해 : 모의 생분해성 시험

I. 개요

1. 목적

본 시험의 목적은 호기성 자연수에서 낮은 농도의 시험 물질의 생분해에 소요되는 시간을 측정하고, 관찰 결과를 반응속도 형태로 정량화하는 것이다. 본 모의시험은 자연 지표수(민물, 반염수 또는 해수) 시료에서 유기물질의 호기성 생분해율을 결정하기 위하여 실험실에서 교반 플라스크를 이용하여 실시한다.

2. 정의

2.1 일차 생분해(Primary biodegradation)

시험 물질이 미생물의 활성으로 인해 화학적 특성을 잃게 되어 일어나는 구조적 변화(변형)

2.2 기능적 생분해(Functional biodegradation)

시험 물질이 미생물의 활성으로 인해 특정 기능(특성)을 잃게 되어 일어나는 구조적 변화(변형)

2.3 최종 호기성 생분해(Ultimate aerobic biodegradation)

미생물이 산소의 존재를 바탕으로 화학물질을 이산화탄소, 물, 무기염 및 다른 무기원소(분자)로 전환하는 분해 및 새로운 생체량 및 유기 미생물 생합성 산물을 생산하는 과정

2.4 무기화(Mineralisation)

미생물이 산소의 존재를 바탕으로 화학물질을 이산화탄소, 물, 무기염 및 다른 무기원소(분자)로 전환하는 분해

2.4 지연기(Lag phase)

시험의 시작으로부터 미생물에 의한 분해가 시작되는 시점 즉, 물질 분해 정보가 감지 가능한 수준(이론상 최대 분해량의 10 %, 또는 측정 기술의 정확도에 따라 이보다 낮은 수준)이 되기까지의 기간

2.5 최대 생분해 수준(Maximum level of biodegradation)

더 이상 분해가 진행되지 않는, 화학물질 또는 유기물의 생분해 수준 (%)

2.6 일차 기질(Primary substrate)

미생물 군집의 성장 및 유지를 위해 자연 탄소 및 에너지원의 집합

2.7 이차 기질(Secondary substrate)

매우 낮은 농도로 존재하는 기질. 주요 기질 구성요소(일차기질)의 분해를 통하여 공급되는 탄소 및 에너지와 비교하여, 분해가 일어남에 따라 미생물에 공급되는 극소량의 탄소량 및 에너지

2.8 분해 속도 상수(Degradation rate constant)

일차 반응 또는 유사일차 반응속도 상수 k (d^{-1})는 분해의 속도를 표시함. 일반 batch 실험의 경우, 지연기 이후 얻어진 분해곡선의 초기부분에서 k 를 계산

2.9 반감기(Half-life, $t_{1/2}$ (d))

일차반응 속도를 정의하기 위해 사용되는 용어. 반감기 및 분해속도 상수는 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 로 나타냄

2.10 분해 반감기(DT_{50} (d), Degradation half time)

분해 시험의 결과를 통하여 얻은 결과를 표현하기 위한 용어. 지연기를 포함하여 50 %의 생분해율을 얻는데 걸리는 시간을 의미

2.11 검출한계 및 정량한계(LOD, Limit of detection, LOQ, Limit of quantification)

LOD는 분석시료에서 대조시료와 통계적으로 다르게 결정될 수 있는 가장 낮은 농도이며, LOQ는 신뢰할만한 정확성으로 정량이 가능한 가장 낮은 농도

2.12 용존 유기탄소(DOC : Dissolved organic carbon)

물 시료에서 특정한 상분리 방법(예, 15 분간 $40,000\text{m/s}^2$ 원심분리 또는 $0.2\ \mu\text{m}$ ~ $0.45\ \mu\text{m}$ pore size의 필터로 여과)으로 분리할 수 없는 유기탄소 부분

2.13 총 유기 ^{14}C 활성(TOA : Total organic ^{14}C activity)

유기탄소와 결합된 ^{14}C 활성 총량

2.14 용존 유기 ^{14}C 활성(DOA : Dissolved organic ^{14}C activity)

용존 유기 탄소와 결합된 전체 ^{14}C 활성 총량

2.15 입자 유기 ^{14}C 활성(POA : Particulate organic ^{14}C activity)

입자 유기탄소와 결합된 전체 ^{14}C 활성 총량

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험법의 적용

1.1.1 이 방법은 낮은 농도의 휘발성물질 또는 약간의 휘발성이 있는 유기화합물 질에 적용가능하다. 대기로 노출(면숨으로 막은)되는 열린 플라스크를 이용했을 때, Henry's law 상수가 $1\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ (대략 $10^{-5}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$) 정도 되는 물질을 휘발성 물질로 간주한다. 휘발성이 약간 있는 물질 (Henry's law constants $100\ \text{Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하 또는 $10^{-3}\ \text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하)을 시험하는 경우, 시험물질의 손실을 줄이기 위해 입구를 밀폐한 플라스크를 사용할 수 있다. 생분해 반응을 확인하기 위하여 시험물질의 농도는 물에 대한 용해도보다 낮아야 한다. 물에 대한 용해도가 낮은 시험물질을 희석할 때 자연수를 사용하기도 한다.

1.1.2 모의 생분해성 시험은 부유물이 없는 지표수에서 수행하는 방법(표층시험, Pelagic test) 또는 물/퇴적물 사이에 존재할 수 있는 부유물이 있는 지표수에서 시험을 수행하는 방법(Suspended sediment test) 2 가지가 가능하다.

1.2 시험물질 정보

방사성 동위원소 표지(Radio labelled) 화합물이나 비표지(Non-labelled) 화합물 모두 시험에 사용할 수 있다. ^{14}C 표지 기술을 사용하는 것이 일반적으로 권장되며, ^{14}C 표지는 분자의 가장 안정적인 부분에 하도록 하며, 쉽게 분해될 수 있는 결합의 양쪽 모두에 ^{14}C 표지를 하는 것이 권장된다. 시험 물질의 화학적 및/또는 방사능 화학적 순도는 95 % 이상이어야 한다. 최초 농도가 낮게 설정된 시험에서 ^{14}C 측정을 돕기 위해 동위원소로 표지한 물질의 특수 활성은 대략 $50 \mu\text{Ci/mg}$ (1.85 MBq) 또는 이상이어야 한다.

시험물질에 대하여 다음과 같은 정보의 확보가 필요하다.

- 1) 수용해도
- 2) 유기용매에 대한 용해도
- 3) 해리상수(Dissociation constant: pK_a) : 물질이 양자화(Protonation) 또는 탈양자화(Deprotonation) 되는 경우
- 4) 증기압, Henry's law 상수
- 5) 물 및 암실에서의 화학적 안정성(가수분해)
- 6) 물에 대한 용해도가 매우 낮은 물질을 해수에서 시험하는 경우, 염석상수 (Salting out constant 또는 "Setschenow constant") K_s 를 알아두는 것이 도움이 될 수 있다. K_s 는 $\log (S/S') = K_s \cdot C_m$ 로 정의되며, S 및 S' 는 각각 민물과 해수에서의 용해도이며, C_m 은 염분 몰 농도이다.

시험을 부유 퇴적물(Suspended sediment) 조건으로 수행하는 경우, 다음과 같은 정보가 필요할 수 있다.

- 1) N-octanol/물 분배계수
- 2) 흡착계수(Adsorption coefficient)

다른 유용한 정보로는 다음과 같은 항목이 있다.

- 1) 환경 내 농도(알려져 있거나 추정된 값)
- 2) 미생물에 대한 시험물질의 독성
- 3) 이분해성 또는 난분해성
- 4) 토양과 퇴적물/물 전이 연구에서의 호기성 또는 혐기성 생분해성

1.3. 시험대조물질(Reference substance)

일반적으로 호기성 환경에서 쉽게 분해되는 물질(예, Aniline 또는 Sodium benzoate)을 참고 물질로 사용한다. 아닐린 및 소듐 벤조에이트의 추정 분해 시간은 일반적으로 2 주 미만이다. 시험대조물질을 사용하는 목적은 시험용수에서의 미생물의 활성이 시험 가능한 기준범위 이내에 있음을 확인하기 위함이다.

2. 품질기준(Quality criteria)

2.1. 회수율

시험물질을 첨가한 직 후, ^{14}C 의 측정 또는 비표지 물질인 경우 화학적인 분석방법을 통하여, 농도 그룹 당 최소 두 샘플에 대해 최초 각 시험농도를 확인해야 한다. 이를 통하여 분석방법의 적용능력 및 반복능력은 물론 시험 용기 내의 시험물질의 균질성, 분포도를 확인할 수 있다. ^{14}C 로 표지 시험물질에 대하여, 시험 종료 시 회수율 정도는 질량수지로 계산하며, 범위는 90 % ~ 110 %가 되어야 한다. 비표지 물질의 경우 초기 회수율은 70 % ~ 110 % 범위 내에 있어야 한다. 그러나 이 범위들을 목표로 해석되어야 하며, 시험의 타당성을 인증하는 기준으로 사용되어서는 안 된다.

2.2. 분석 방법의 재현성 및 감도

- 2.2.1. 시험물질과 전환물질을 정량화하는데 분석방법의 재현성 확인은 지표수의 추출은 각각 5회 반복적으로 추출, 분석한다.
- 2.2.2. 시험물질과 전환물질의 검출한계(LOD)는 초기 농도의 최소 1 %가 되어야 한다. 정량한계(LOQ)는 초기 농도의 10 % 또는 그 이하이어야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험장비

시험은 적절한 용량(0.5 L 또는 1.0 L)의 원뿔형(Conical) 또는 원통형 플라스크를 실리콘 또는 고무마개로 막아서 사용하거나, 혈청수집용 플라스크에 CO₂ 밀폐 마개(예, Butyl rubber septa)를 사용한다. 비표지 물질의 사용 시, 비휘발성 시험물질에 대해서는 기체 밀폐 마개 또는 뚜껑을 사용할 필요가 없으며, 면숨으로 입구를 막아 공기에서부터 들어올 수 있는 오염원만 막아주도록 한다. 휘발성이 약간 있는 물질은 Biometer-type system을 사용해야 한다. 박테리아 오염의 발생을 방지하기 위해, 모든 용기는 사용 전에 열 멸균처리하거나 멸균한다. 또한, 다음과 같은 표준 실험실 장비가 사용된다.

- 1) 교반 테이블 또는 자석 교반기
- 2) 원심분리기
- 3) pH meter
- 4) 물의 혼탁도 측정을 위한 탁도계(Turbidimeter)
- 5) 건조중량 확인을 위해 사용할 오븐 또는 전자오븐
- 6) 멤브레인 여과(Membrane filtration) 장치
- 7) 유리 용기의 열 멸균을 위한 멸균 또는 오븐
- 8) ¹⁴C 표지 물질을 다루기 위한 설비
- 9) CO₂ 흡수용액 또는 퇴적물에서 ¹⁴C-activity 확인할 수 있는 장치
- 10) 시험물질(또는 시험대조물질)의 확인을 위한 분석장비 (GC, HPLC 등)

3.2. 시험물질의 농축용액(Stock solution)

시험물질 및 시험대조물질의 저장용액을 만들기 위해 탈이온수를 사용한다. 탈이온수는 미생물에 대한 독성영향이 없는 것을 사용하며, 용존 유기탄소 (DOC : Dissolved organic carbon)가 1 mg/L 이하여야 한다.

3.3. 지표수의 수집 및 운반

지난 4 년 간, 대상 시험물질 또는 구조상 유사한 물질에 의한 오염이 있었던 경우에는 이전에 해당 장소에서의 분해 연구 시험결과가 알려져 있지 않으면, 해당 장소의 지표수 시료를 사용하지 않도록 한다. 채취 시, 지표수의 pH와 온도 및 시료 채취 깊이 및 외관(예, 색깔 및 탁도)을 반드시 기록해야 한다. 채취한 지표수를 옮길 때에는 청결한 용기를 이용하며, 시료를 이동하는 동안에는 시험 시 사용할 온도와 급격한 차이가 나지 않도록 유의한다. 운반 시간이 2 시간 ~ 3 시간 이상인 경우, 4 °C로 보관하도록 한다. 지표수 시료는 얼리지 않도록 한다.

3.4. 지표수의 보관 및 준비

시험은 반드시 샘플 채취 후 1 일 이내에 실시하도록 한다. 샘플의 보관이 필요한 경우, 보관 기간을 최소화하며, 4 주 이상 보관은 피하도록 한다. 시험을 시작하기 전까지 지표수 시료는 4 °C에서 공기를 공급하면서 보관한다. 시험 시작 전 100 µm 메시 나일론 필터 또는 성긴 종이 필터를 이용하여 굵은 입자 또는 퇴적물을 제거한다.

3.5. 퇴적물로 보정된 물 준비[선택 사항]

부유퇴적물 시험을 위하여, 자연수가 포함된 플라스크에 퇴적물을 첨가(굵은 입자를 여과하여 제거한 시료) 하여, 부유고형물 농도를 0.01 g/L ~ 1 g/L 사이가 되도록 한다. 표면 퇴적물은 물 시료를 채취한 같은 장소에서 채취한 것을 사용한다. 표면 퇴적물은 다음과 같이 준비한다. 투명한 플라스틱 튜브를 사용하여 몇 개의 퇴적물 코아로 시료를 채취한 후, 상부의 공기와 접하는 부분(표면에서 약 5 mm 깊이)들을 잘라내어 합친다. 퇴적물 시료는 호기성 상태를 유지하기 위하여 내부용적이 넓은 용기에 담아 호기성상태로 운반한다(운반 시간이 2 시간 ~ 3 시간을 넘는 경우 4 °C로 유지). 퇴적물 시료는 1 : 10 비율로 시험용수에 혼합하여 사용할 때까지 4 °C에서 공기를 공급한다. 퇴적물의 보관기간은 최소화 하도록 하나 보관이 필요한 경우 4 주를 넘기지 않도록 한다.

3.6. 반-연속식(Semi-continuous) 방법 [선택사항]

시험물질의 뚜렷한 분해가 일어나는데 지연기(Lag time)가 길어지는 경우에는 배양기간의 연장(수개월)이 필요하다. 이 물질의 예비 시험을 통하여 이와 같은 사실이 알려져 있는 경우, 시료수는 또는 부유물의 일부분을 주기적으로 새로 주입하는 반-연속적 방법으로 시작할 수 있다. 만약 Batch 실험을 이용하여 약 60일간 시험물질의 분해가 일어나지 않으면, 일반적으로 Batch 실험은 반-연속식으로 변경하여 수행할 수 있다.

3.7. 시험 물질(또는 시험대조물질)의 첨가

3.7.1. 물에 대해 높은 용해성(1 mg/L 이상)과 낮은 휘발성(Henry's law Constants $1 \text{ Pa}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하 또는 $10^{-5} \text{ atm}\cdot\text{m}^3/\text{mol}$ 이하) 물질의 경우, 탈이온수로 저장용액을 만들 수 있다. 원하는 농도에 맞게 적절한 양의 저장용액을 시험용기에 첨가한다. 저장용액의 첨가량은 가능하면 최소화(최종시험액 용량의 10% 이하)하여야 한다. 다른 방법으로, 시료수가 많은 양일때는 시험물질을 용해시키기 위하여 유기용매를 사용할 수도 있다.

3.7.2. 수용해도가 낮은 비휘발성 물질의 저장용액을 만들 때에는 휘발성 유기용매를 사용하여 준비한다. 그러나 시험과정에 더해지는 유기용매의 양은 1 % v/v를 넘지 않도록 해야 하고, 미생물 활성에 영향을 주지 않도록 한다. 또한 유기용매의 사용으로 물에 있는 시험물질의 안정성에도 영향을 주지 않도록 최소한의 양이 되도록 탈기시켜야 한다. 용매의 사용을 극소화하여, 물 시료 및 부유물의 DOC 농도의 증가에 영향을 주지 않도록 해야 한다. DOC 분석이 가능한 경우, 적합한 분석방법으로 확인하도록 한다. 시험물질의 첨가를 위해 유기용매를 사용하는 경우, 물 시료를 포함하는 용매 대조군과 시험대조물질이 첨가된 물 시료는 용매중의 시험물질로 보정되도록 시험용기가 동일하게 처리되어야 한다. 용매 대조군을 사용하는 목적은 유기용매의 첨가로 인하여 시험대조물질의 분해에 영향을 주는 미생물군에대한 영향을 확인하기 위함이다.

3.8. 시험 조건

3.8.1. 시험 온도

배양은 채취 현장의 온도 또는 기준온도($20\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)로 조절된($\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) 암실 (권장됨) 또는 빛을 줄인 환경에서 수행하도록 한다. 채취 현장의 온도는 실제 장소의 지표수 온도 또는 채취 현장의 평균 온도를 사용하도록 한다.

3.8.2. 교반

부유물 중의 입자와 미생물들이 유지되도록 연속적으로 교반을 해야 한다. 교반은 용기 상부의 산소를 용액 중으로 전달시키는 장치로서 호기성으로 적정하게 유지 되도록 한다. 교반은 반드시 지속적으로 실시하며, 용액이 균질한 상태가 유지되도록 가능하면 부드럽게 한다.

3.8.3. 시험 기간

(1) 시험기간은 시험용 부유물질을 주기적으로 교체해야 하는 반-연속식 방법을 사용하지 않는 한, 대체로 60 일을 넘기지 않도록 한다. 그러나 시험물질의 분해가 최초 60 일 동안 일어나지 않는 경우, 일반 시험을 위해 기간은 최대 90 일까지 연장할 수 있다. 일정 시간 간격으로 ^{14}C 활성 또는 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 양을 확인하거나 화학적인 분석방법을 통해 시험물질의 분해를 관찰한다. 분해 과정을 평가할 수 있도록 배양시간을 충분히 두도록 한다. 동력학적인 분해 속도 상수 평가를 가능케 하기 위하여 50 % 이상 분해가 되도록 하고, 분해가 느린 물질의 경우 20 % 이상의 분해를 기준으로 한다.

(2) 물과 퇴적물 시료로 사전에 유사한 시험결과가 없는 경우, 시험 시스템의 pH와 산소농도는 주기적으로 측정한다. 물과 퇴적물 시료는 일부 조건에서 매우 높은 농도의 일차물질의 대사가 일어나는 경우, 많은 양의 CO_2 발생과 산소 감소가 발생함으로써 시험기간 중에 조건 변화가 일어날 수 있다.

4. 시험과정

4.1. 표층시험(Pelagic test)을 위한 플라스크의 준비

4.1.1. 적절한 용량의 시험수를 시험용 플라스크 용량의 1/3까지, 100 mL 이상 채워 넣는다. 여러 개의 플라스크를 사용하는 경우(각 시료 채취 시 플라스크 전체를 사용하는 경우), 시험양이 지나치게 적은 경우 지연기의 길이에 영향을 줄 수 있기 때문에, 적절한 시험수의 용적은 100 mL가량이다.

분해반응 및 분해속도 상수를 계산하기 위해 5 배 ~ 10 배가량 다른 물질을 최소한 두 개 이상의 농도를 사용하도록 한다. 선택한 농도 모두 100 $\mu\text{g/L}$ 이하여야 하며, 1 $\mu\text{g/L}$ ~ 10 $\mu\text{g/L}$ 범위가 권장된다.

4.1.2. 플라스크를 공기나 CO_2 가 통하지 않도록 마개를 덮는다. ^{14}C 표지가 없는 시험물질을 사용하는 경우, 주요 분해산물이 비휘발성으로 알려졌고, 간접적으로 CO_2 측정을 수행해야 하므로 면솜으로 입구를 막아 공기로부터 오염원이 들어오는 것을 방지한다.

4.1.3. 시험 시작 시점(생물학적 분해가 시작되는 시점)과 일정 시간간격으로 시료를 채취하여 화학적 분석 또는 ^{14}C 활성을 측정한다. 시험물질의 처리는 직접, 혹은 간접적인 방법으로 확인한다. 일반적으로 신뢰할만한 속도상수를 구하기 위하여, 신속히 분해되는 물질의 경우 세 번의 시료채취가 충분하다는 것에 대한 합당한 근거를 제시하지 않는 한, 분해 기간(즉, 지연기직후) 동안 최소 다섯 번의 시료 채취를 수행한다. 분해가 즉시 일어나지 않는 시험물질에 대해서는 분해기간 동안 더 빈번한 측정을 수행하게 되므로, k 를 구하기 위해 더 많은 데이터를 사용한다. 시험 물질에 따라 분해기간이 달라지므로 시료채취는 꼭 정해진 스케줄에 실시하지는 않는다. 그러나 분해가 느린 경우에는 일주일에 1 회 측정한다. 만일 시험물질의 분해가 빠른 경우, 시험 시작 후 3 일간 매일 측정 하고, 이후 2 일 ~ 3 일에 1 회 측정한다. 가수분해가 매우 빠르게 일어나는 특별한 경우에는 시간당 시료를 측정해야 하는 경우도 있다. 시료채취 간격을 정하기 위해 예비실험을 수행하는 것이 권장된다.

4.2. 플라스크와 시료의 수

4.2.1. 충분한 수의 시험플라스크를 준비 :

- (1) 시험플라스크 : 반복적인 시료채취로 인하여 플라스크가 회수되는 것을 감안하여 시험물질의 각 농도에 대하여 최소한 두개의 반복군을 두거나(최소 3 개가 권장됨) 여러 개의 시험플라스크를 준비한다(이하 F_T)
- (2) 물질수지 계산을 위한 시험플라스크; 각 시험 농도에 대해 최소한 두 개 이상의 플라스크 사용(이하 F_M)
- (3) 시험물질 포함하지 않는 대조군; 시험수만 포함하여 최소한 하나의 대조군 플라스크(이하 F_B)
- (4) 기준대조군 : 시험대조물질(즉, 10 $\mu\text{g/L}$ 농도의 Aniline 또는 Sodium benzoate) 대조군에 대한 플라스크 두개 (이하 F_C). 대조물질을 사용하는 이유는 최소한의 미생물 활성을 확인하기 위함이다. 가능하면 동위원소로 표지된 시험대조물질을 사용하며, 시험물질의 분해는 화학적 방법으로 측정한다.
- (5) 멸균 대조군 : 시험물질의 생물학적 분해가 아닌 것을 확인하기 위하여 하나 혹은 두개의 플라스크에 멸균한 시험수를 넣고 시험을 수행한다 (이하 F_S). 생물학적 활성을 배제하기 위하여 멸균 (121 $^{\circ}\text{C}$, 20 분간) 하거나 독성물질(e.g. Sodium azide (NaN_3) 10 g/L ~ 20 g/L , Mercuric chloride (HgCl_2) 100 mg/L 또는 포르말린 100 mg/L)을 첨가하거나 감마 광선을 조사한다. 만일 HgCl_2 를 사용하는 경우, 시험 후, 독성 폐기물에 포함시켜 폐기하도록 한다. 시험수 중 다량의 퇴적물이 추가된 경우, 멸균 조건을 달성하기가 어렵다. 이와 같은 경우에는 멸균을 반복적으로 실시(세 번)하는 것이 권장된다. 반복된 멸균으로 인하여 퇴적물의 흡착 특성이 바뀔 수 있다는 사실을 염두에 두어야 한다.
- (6) 시험수 및 시험수와 시험대조물질이 포함된 유기용매 대조군; 시험물질의 저장용액에 들어간 동일 량의 유기용매를 첨가한 대조군을 두개 이상 사용한다. 이를 사용하는 이유는 유기용매가 참고물질의 분해에 영향을 주는지 알아보기 위함이다.

4.2.2. 시험을 설계함에 있어서 연구자는 시험 반복군의 증가와 시험수 증가간의 상관성을 감안해야 한다. 분해 측정시 사용하는 방법에 따라 필요한 플라스크의 수를 정확히 판단할 수 있다.

4.2.3. 각 시료채취 시, 시험 플라스크에서 두 개의 서브샘플(예, 5 mL씩)을 채취하도록 한다. 플라스크 전체를 채취할 수 있도록 여러 개의 플라스크를 사용하는 경우, 각 시료채취 시점에서 최소 두 개의 플라스크를 채취한다.

4.3. 부유퇴적물 시험의 플라스크 준비[선택사항]

필요한 양의 시험수와 퇴적물을 시험 용기에 넣는다. 부유퇴적물 부유 시험을 위한 플라스크를 준비하는 과정은 표층시험과 동일하다. 혈청수집용 시험관(Conical tube) 또는 유사한 모양의 플라스크 사용을 권장한다. 밀폐된 플라스크를 shaker에 가로로 놓는다. ^{14}C 표지를 쓰지 않은 물질, 비휘발성 물질 시험에 사용하는 개방형 플라스크는 세워서 놓는다. 이 경우에는, 자석 Stirring 및 유리로 코팅된 Magnetic bar를 사용할 것이 권장된다. 필요한 경우, 적절한 호기성 조건을 유지하기 위하여 공기를 공급한다.

4.4. 동위원소의 측정

4.4.1. 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 는 직접 혹은 간접적으로 측정할 수 있다. $^{14}\text{CO}_2$ 를 간접적으로 측정하는 경우 pH 2 ~ 3 정도로 산성화 시킨 후 CO_2 를 배제시킨 후 시험수 또는 부유물질에서 최초 ^{14}C 활성과 각 시료채취 시점에서의 잔존활성 사이의 차이를 비교한다. 이와 같은 과정을 거쳐 무기탄소는 제거되며, 유기 물질로부터 유래된 잔존 활성도를 측정하게 된다. 시험 물질의 변형이 일어나는 동안 주요 휘발성 전환물질이 생성되는 경우 간접적인 $^{14}\text{CO}_2$ 의 측정방법은 사용할 수 없다. 가능하면, 각 시료채취 시, 최소 각 하나의 플라스크에서 $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생을 직접 측정하도록 한다. 이와 같은 과정에서 질량수지 및 생분해 과정을 확인해야 하며, 밀폐된 플라스크를 시험을 수행해야 한다.

4.4.2. 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 를 시험기간 동안 직접적으로 측정하는 경우, 시험을 시작할 때 더 많은 플라스크를 준비한다. 시험물질의 분해가 일어나는 동안 주된 산물이 휘발성인 경우, 직접적으로 $^{14}\text{CO}_2$ 측정을 실시하는 것이 권장된다. 각 측정 시점에서 내부 또는 외부의 흡수장치에 수집된 $^{14}\text{CO}_2$ 를 산성화(pH 2 ~ 3) 한 다음 측정한다.

4.4.3. ^{14}C 로 표지된 시험물질 및 주요 전환물질의 농도는 Radiochromatography(즉, Thin layer chromatography, RAD-TLC) 방법 또는 동위원소 검출이 가능한 HPLC를 사용하도록 한다.

4.4.4. 시험 종료 시, 시험 기간 동안 시료를 채취한 적이 없는 플라스크를 분리하여 직접적인 $^{14}\text{CO}_2$ 측정을 통해 물질 수지를 확인한다.

4.5. 특정 화학물질의 분석

4.5.1. 만일 감도가 높은 특정한 화학물질 분석이 가능할 경우, 일차적인 생분해도를 구하기 위하여, 동위원소 검출방법 대신 시험물질의 전체 잔존 농도를 측정한다. 동위원소로 표지된 시험물질을 사용하는 경우(전체 무기화를 측정하기 위해), 유용한 추가적인 정보를 제공하고, 절차를 확인하기 위해 특정한 분석방법을 사용할 수 있다. 화학물질 분석방법은 시험물질의 분해가 일어나는 중에 발생하는 전환물질을 측정하기 위해 사용하며, 이 방법은 시험물질의 반감기가 60일이 넘는 경우 권장된다. 매 시료채취 시간마다 시험물질 및 전환물질의 농도를 측정하고 보고한다(농도당, 처리한 물질의 %로 나타냄). 일반적으로 각 시료채취 시점에서 전환물질은 적용된 농도의 10 % 이상 검출된 경우에 동정한다. 동정을 하지 않는다면 합리적인 근거를 제시해야 한다. 시험기간 동안 꾸준히 전환물질의 농도가 증가하게 되면 이 물질의 동정이 필요하다. 농도나 위에서 나타낸 제한 농도를 초과하지 않으며 분해가 잘 되지 않음을 의미한다. 시험물질의 신속한 전환(예, 가수분해)이 일어나는 경우에는 멸균 대조군에서 전환물질에 대한 분석이 검토되어야 한다. 각각의 경우에 따라 전환물질의 동정과 정량이 필요하며, 이에 대한 합당한 근거가 보고서에 제시되어야 한다. 관련된 분석 절차에서 주어진 방법에 따라 유기용매를 이용하여 추출방법을 사용해야 한다.

4.5.2. 모든 시료는 2 °C ~ 4 °C 밀폐용기에 보관하며, 분석은 24 시간 이내에 하는 것이 권장된다. 더 긴 기간 보관하는 경우, 시료를 -18 °C 또는 화학적으로 보관한다. 시료를 산성화시켜 보관하는 것은 시료의 안정성 측면에서 권장하지 않는다. 만일 시료를 24 시간 내에 분석하지 않고 더 오래 보관하는 경우에는 저장 안정성에 대한 시험이 수행되어야 하고, -18 °C 또는 다른 저장조건에서 화학물질이 안정하다는 확인자료가 필요하다. 만일 분석 방법에 용매추출 또는 고상추출(SPE)이 포함되는 경우, 시료채취 직후 추출을 수행하거나 추출전 최대 24 시간 동안 시료를 냉장고에 보관할 수 있다.

4.5.3. 분석 방법의 감도에 따라 많은 시료 량이 필요할 수 있다. 2 L ~3 L 용량의 플라스크를 이용해 1 L의 시험용량을 수행할 수 있으므로, 이 경우에는 100 mL 까지의 시료를 채취하는 것이 가능하다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. 데이터 plot

1.1.1. 시료채취 시간을 날짜가 아닌 시간별로 정수로 반올림한다. 시험물질의 잔류 활성(^{14}C 표지 물질) 또는 잔류 농도(^{14}C 표지가 없는 물질)를 시간에 대하여 선형 및 반 로그(Semi-logarithmic)로 나타낸다. 물질의 분해가 일어나는 경우, F_T (시험군)를 F_S (멸균군)와 비교한다. F_T 에서의 평균값이 F_S 와 10 % 이상의 차이가 없는 경우, 관찰된 물질은 거의 생물학적으로 제거가 안되는 것으로 예상된다. 생분해율을 추산하기 위하여, F_S 의 분해율이 낮은 경우, F_T 값을 빼줌으로써 그래프를 보정한다. 주요 전환물질을 확인하기 위한 다른 분석법이 수행되는 경우, 그래프에 시험물질 자체의 감소는 물론, 해당 산물의 증가양상을 추가하도록 한다.

1.1.2. 직선부분을 무분해(Zero degradation)로 외삽(Extrapolate)하거나 10 % 가량의 분해 시간을 추정함으로써 분해 곡선(Semi-logarithmic plot)에서 지연기(Lag phase) 기간 t_L 을 구한다. Semi-logarithmic plot에서 시간에 따라 일차반응 속도상수, k 및

ln (잔류 ^{14}C 활성 또는 시험물질 농도)에서의 직선 회기 방법으로 표준편차를 구한다. 특히 ^{14}C 를 측정하는 경우, 전체 곡선에서 지연기가 끝나는 최초 직선 부분의 데이터만 사용하며, 불확실한 데이터에서 더욱 많은 수를 선택하기보다는 적은 수의 대표성 있는 데이터를 골라 제시한다. 여기에서 말하는 불확실성에는 측정된 잔류 ^{14}C 활성을 직접 사용할 때 발생할 수 있는 자체의 에러를 의미한다. 여기에는 만일 분해양상이 두 개의 형태로 나타나는 경우, 두 개의 상이한 속도 상수를 계산하여 나타낼 수 있다. 이와 같은 목적을 위해 분해곡선은 두 개의 다른 형태로 정의된다. Subsample을 한 플라스크에서 채취한 경우 속도 상수 k 및 반감기 $t_{1/2} = \ln 2/k$ 계산을 각 반복군 플라스크에 대해 수행하며, 각 시료 채취기간에 플라스크를 모두 사용한 경우에는 이 값들의 평균값을 사용하여 계산한다. 전자의 절차를 사용하는 경우, 각 반복군에 대하여 속도 상수 및 반감기를 표준편차를 포함한 평균값을 보고해야 한다. 고농도의 시험물질이 사용된 경우, 분해곡선이 직선이 아닌 Semi-logarithmic plot의 형태로 나올 가능성이 높으며, 이 경우 일차반응은 유효하지 않다. 따라서 이 경우 반감기를 정의하는 것은 별 의미가 없다. 그러나 제한된 데이터 범위 때문에 유사일차반응을 적용할 수 있으며, 분해 반감기 DT_{50} (50 % 분해까지 소요되는 시간)을 추산할 수 있다. 그러나 DT_{50} 은 주어진 데이터에 대한 사실을 보여주는 것이므로, 선택한 데이터 범위 밖의 분해 양상에 대해서는 DT_{50} 을 사용하여 확인이 불가능하다. 통계적 계산 및 곡선의 적합을 용이하게 해 주는 소프트웨어를 사용할 것이 권장된다.

1.1.3. 특수한 화학분석 방법을 활용하는 경우, 일차 분해에 대한 속도 상수 및 반감기를 전체 무기화에 대하여 계산한다. 일차 분해가 제한된 과정인 경우, 전체 분해 과정에서 데이터 포인트를 사용할 수 있다. 이는 ^{14}C 활성의 측정에 대조하여 측정이 이루어지기 때문이다.

1.1.4. ^{14}C 표지 물질이 사용되는 경우, 시험 종료 시에 물질수지는 최초 사용한 농도에 대하여 %로 나타낼 수 있다.

1.2. 잔류 활성

시험물질에서 ^{14}C 로 표시된 부분이 분해되는 경우, ^{14}C 의 주요부분은 $^{14}\text{CO}_2$ 로 전환되며, 나머지는 시험 용기 내 미생물의 합성 및 세포외 대사에 사용된다. 따라서 완전히 “최종” 생분해는 물질의 100 %가 $^{14}\text{CO}_2$ 로 변환되는 것은 아니다. 생합성을 통하여 형성되는 ^{14}C 는 “이차 무기화”를 통하여 $^{14}\text{CO}_2$ 로 천천히 발생된다. 이 같은 이유로, 잔류 유기 ^{14}C 활성(CO_2 탈기 후 측정) 또는 시간당 생성된 $^{14}\text{CO}_2$ 는 분해가 마무리 된 후 “꼬림 효과(Tailing)”를 보이게 된다. 이 때문에 데이터의 역학 분석이 복잡해 질 수 있으므로(50 % 분해가 달성되기 전에 지연기가 끝나는 경우), 일반적으로 분해 속도 상수를 추산하기 위해 곡선의 시작부분만을 사용한다. 만일 시험물질이 감소하는 경우, 전체 잔류 유기 ^{14}C (분해된 부분) 활성은 항상 원래 물질에 표지된 ^{14}C 활성보다 높게 나타난다. 만일 시험물질이 일차반응을 통해 분해되는 경우, 시험물질의 지속 부분은 CO_2 로 무기화가 일어나며, ^{14}C 감소곡선(전체 유기 ^{14}C 와 시간 관계)에서 시작부분의 기울기는 시험물질의 농도에 대한 해당 곡선의 배수가 된다(더 정확히 하기 위해 ^{14}C 로 표지된 시험물질).

2. 결과의 해석

2.1. k값이 첨가된 농도에 독립적인 경우(계산된 k 값이 대략 시험물질의 농도차와 거의 동일할 때), 일차반응속도 상수가 사용된 시험조건은 시험 물질, 물 시료 및 시험 온도를 반영하는 것이라고 가정할 수 있다. 높은 농도의 시험물질을 사용한 경우, 일차반응을 따르지 않으므로, 데이터를 일차반응속도 상수 또는 이에 따른 반감기 분석을 위해 사용할 수 없다. 그러나 전체 무기화의 정도 및/또는 검출 및 정량정도를 확인하기 위해 높은 농도의 시험물질을 사용한 결과를 활용할 수 있다.

2.2. 가수분해 또는 휘발 등의 영향이 있는 경우 생물학적 분해량만을 계산하기 위하여, 전체 분해속도에서 다른 분해과정을 빼주어야 한다.

2.3. $^{14}\text{CO}_2$ 의 직접, 간접 측정 결과는 CO_2 에 대한 시험물질의 무기화 범위를 통하여 사용할 수 있다. ^{14}C 표지된 물질 및 주요 변형 산물의 농도분석을 위해

Radiochromatography (RAD-TLC) 또는 HPLC를 사용한다. 반감기를 직접 계산하기 위해서는 다른 주요 전환물질(사용한 시험물질 양의 10 % 이상으로 정의)이 잔존하지 않는다는 사실이 증명되어야 한다. 실제 생분해(무기화 및 생물학적 질량에 포함된 양)에 대한 이해를 돕기 위해, 시험의 종료 시 ^{14}C 의 phase 분포를 분석한다. ^{14}C 전체량에는 미생물 중량에 포함되거나 유기물에 흡착된 양 모두가 포함된다.

3. 시험의 타당성

- 3.1. 시험대조물질(Aniline 과 Sodium benzoate)이 2 주 이내에 분해되지 않는 경우 재확인을 위해 다른 지표수 샘플을 이용해 재시험을 수행한다.
- 3.2. 시험의 종료 시 전체 회수율(Mass balance)은 동위원소 표지군에서 90 % ~ 110 %이어야 하며, 비표지 물질의 회수율은 70 % ~ 110 %여야 한다. 이 범위는 목표로서 해석되어야 하고, 시험의 허용 기준으로 이해해서는 안 된다.

4. 시험결과의 보고

결과 보고서에는 시험의 종류(즉, Pelagic 또는 부유침전물 시험 여부)를 반드시 기재해야 하고 다음과 같은 사항을 기재한다.

4.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

4.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

4.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

4.4. 시험물질 및 참고 물질

- 일반명, 화학물질명(IUPAC명명 및/또는 CAS명), CAS 번호, 구조식(또는 ^{14}C 의 위치) 및 시험물질, 참고물질의 물리·화학적 성상
- 전환물질의 정량 및 동정시 사용한 표준품의 일반명, CAS명, CAS 번호, 구조식(또는 ^{14}C 의 위치) 및 물리·화학적 성상
- 시험 물질 및 시험대조물질의 순도(불순물 함유도)
- 동위원소 표지 물질의 동위원소 순도 및 비활성도(Specific activity)

4.5. 지표수

- 오염 기록을 포함한 시료 채취 장소에 대한 세부사항
- 시료 채취 날짜 및 시간, 영양분(총질소, 암모니아, Nitrate, nitrite, 총인, 용해된 Orthophosphate)
- 채취 깊이
- 시료의 외관 (예, 색깔 및 탁도)
- DOC, TOC, BOD
- 채취 장소의 온도 및 pH, 채취시간
- 산소 또는 산화/환원전위 (호기성조건이 명확하지 않은 경우 반드시 보고)
- 염도 또는 전도성 (해수 및 반염수의 경우)
- 부유물 (탁한 샘플을 사용하는 경우)
- 시료 채취 시 채취 장소에 대한 다른 관련된 정보(예, 강의 유속 또는 해수의 이동율, 주요 배출 및 배출의 형태, 샘플 채취 시 날씨 조건 등)

4.6. 선택적 기재 사항

- 미생물량 (예: Acridine orange 직접 측정 또는 콜로니형성 단위)
- 무기 탄소
- 조류 생물량 평가방법으로서의 클로로필-a 농도

4.7. 부유 퇴적물 시험 수행시 기재 사항

- 퇴적물 채취 깊이
- 퇴적물의 외관 (색깔, 진흙, silt, 모래 등)
- 조성 (예, % Coarse sand, Fine sand, Silt, Clay 등)
- 부유고형물(SS)의 건중량(g/L), 유기물 측정을 위한 TOC농도 또는 작열감량
- pH
- 산소 또는 산화/환원 전위 (호기성 조건이 명확하지 않은 경우 반드시 보고)

4.8. 시험조건

- 시료채취와 시험 사이의 시간차, 시료 보관여부(조건) 및 시험수행을 위해 처리한 시료의 전처리 과정

- 처리한 시험물질의 양, 시험물질 및 참고 물질의 농도
- 사용한 용매 및 시험물질 처리방법
- 지표수 및 퇴적물의 용적(사용한 경우), 각 시료채취 시간당 채취 시료량
- 사용된 시험 시스템의 세부사항. 만일 압 조건이 유지되지 않은 경우, “어두운 빛”으로 보고
- 멸균 대조군을 만들기 위해 사용한 방법(예, 멸균을 실시한 온도, 시간, 회수)
- 배양 온도
- 동위원소 측정 및 물질수지 확인, 상분포 측정을 위해 사용한 분석기술 및 방법
- 반복 수

4.9. 결과

- 회수율(%)
- LOD 및 LOQ를 포함한 분석방법의 재현성 및 감도
- 모든 측정된 데이터(시료 채취 시점 포함) 및 계산 값을 표 및 분해 곡선 형식으로 제공. 각 시험 농도 및 각 반복군 플라스크에 대하여 로그 플롯을 통한 기울기의 선형 비례계수, 추산된 지연기 및 일차반응 또는 유사일차반응속도 상수(가능한 경우) 및 분해 반감기(일반 반감기, $t_{1/2}$)
- 각 반복군에서 측정된 수치의 평균값, 예를 들어 지연기, 분해속도 상수 및 분해 반감기(또는 $t_{1/2}$)
- 분해 곡선의 외향 및 시험 농도에 대한 가능한 영향을 감안하여 적합 또는 비적합의 범주 구분
- 최종 물질수지 확인 및 상분포 측정 결과 (있는 경우)
- ^{14}C 의 무기화 양 및 특수분석 방법이 사용된 경우, 일차분해의 최종수준
- 적용 가능한 경우, 주요 전환물질의 동정, 몰 농도 및 % 농도
- (필요한 경우) 물질의 제안된 전환관련 경로
- 결과의 논의

제13항 미생물분해시험(본질적 분해성) : SCAS 수정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 호기성 조건 하에서 유기물질의 본질적 생분해성을 평가하는 데 그 목적이 있다. 시험 방법은 알킬벤젠술포네이트(Alkyl benzene sulphonate)의 1차 생분해 평가를 위한 SCAS(Soap and detergent association semi-continuous activated sludge) 시험법을 수정한 것이다. 이 시험은 세균의 성장과 번식을 저해하지 않는 수용성, 비휘발성, 유기 화학물질에 대해서 적용 가능하다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved organic carbon)

용해된 상태이거나 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 $4,000 \times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 1차 생분해(Primary biodegradation)

생물학적 활동성을 통해 화학물질의 구조가 변하여 원래의 화학물질이 다른 특성을 갖는 물질로 변화하는 것

2.3 순응접종원(Acclimatised inocula)

생리적 기능이나 상태 등이 주어진 외적 조건에 적응한 접종균주

II. 시험

1. 원리

폭기(SCAS)장치에 하수종말처리장에서 회수된 활성 슬러지를 배치하고 시험물질과 침전조를 거친 생활하수를 가한다. 혼합물에 23 시간 동안 폭기한 후, 슬러지를 침전시키며, 이후 상등액을 취한다. 폭기조에 남아 있는 슬러지에 추가적으로 시험물질과 생활하수를 주입하며, 이 과정이 순차적으로 반복된다. 생분해도(%)는 채취된 상등액의 용존 유기탄소 함량에 의해 결정된다. 상등액의 용존유기물함량을 침전조를 거친 생활하수의 용존유기탄소량과 비교한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 폭기(SCAS)장치

폭기장치는 적절한 방법으로 세척하고 고정한다. 공기유입관은 분배기(Supply manifold)에 연결한다.

2.1.2 공기압축기(Air compressor)

작은 실험실 규모의 공기압축기는 장치에 공기를 공급하는 데 사용하고, 공기는 장치로부터 증발손실을 줄이기 위해 수증기로 포화된다.

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

유기탄소 분석기는 프탈산수소칼륨(Potassium hydrogen phthalate)을 사용하여 보정한다.

2.1.5 원심분리기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 표준물질

새로운 물질을 조사하는 경우 표준물질을 이용한다. 시험방법의 교정 및 다른 시험방법을 통하여 얻은 결과와의 비교가 필요한 경우에는 부록의 자료를 참고한다.

2.4 시험물질 농축액

분해가 거의 되지 않는 시험물질을 대상으로 한다면 일반적으로 20 mg/L의 시험물질을 초기 반응 단계에 투입하게 된다. 보통 요구되는 시험물질 농축액의 농도는 유기탄소로서 400 mg/L이다.

2.5 시험조건

호기성 미생물을 고농도로 사용하고, 이때 효과적인 체류 시간은 36 시간이 적정하다. 하수에 포함된 유기물질은 각 폭기 주기 시작 8 시간 이내에 광범위하게 산화된다. 그 후에 슬러지는 폭기과정의 나머지 시간 동안 내부적으로 호흡을 하는데, 이 기간 동안 시험물질이 산화된다.

3. 시험방법

3.1 시험절차

3.1.1 적절한 활성 슬러지 반응조로부터 슬러지 혼합액 시료를 얻는다. 실험실로 운반하는 동안에는 공기를 공급하며 운반한다.

3.1.2 각 폭기장치를 150 mL의 슬러지 혼합액으로 채우고 23 시간 동안 공기를 공급한다. 폭기를 멈춘 후에 슬러지는 45 분간 정치한 후 마개를 열고 100 mL의 상등액을 취한다.

3.1.3 폭기를 다시 시작한다. 이 단계에서는 장치에 시험물질을 가하지 않고, 침강 후 깨끗한 상등액이 얻어질 때까지(보통 2 주) 매일 생활하수만 공급한다. 이 기간 동안 매 폭기 주기가 끝날 때의 상등액 내 용존유기탄소는 12 mg/L보다 적어야 한다.

3.1.4 각각의 침강된 슬러지들을 혼합하고 그 결과 얻은 50 mL의 합활성 슬러지를 각 장치에 가한다. 대조군 장치에는 100 mL의 침전조를 거친 생활하수를 가하고 시험군 장치에는 95 mL의 생활하수와 5 mL의 시험화합물 농축액(400 mg/L)의 혼합물을 가한다. 23 시간 동안 공기를 공급한 후 슬러지는 45 분 동안 놓아두고, 상등액을 취해서 용존유기탄소 함량을 분석한다.

3.2 장치의 세척

장치는 시험마다 청결해야 하며 액체의 표면 위 쪽으로 고체가 달라붙어 있을 수 있으므로 이를 제거하기 위해 장치의 벽을 세척해야 한다. 교차오염을 막기 위해 각 장치마다 별도의 굵개나 솔을 사용한다.

3.3 용존유기탄소 측정

상등액 내의 용존유기탄소는 원칙적으로는 매일 측정한다. 액체는 분석 전에 0.45 μm 의 세척된 막여과장치로 여과시켜 원심분리 한다. 원심분리 하는 동안 시료의 온도가 40 $^{\circ}\text{C}$ 를 초과해서는 안 된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1 시험군 장치와 대조군 장치의 상등액의 용존유기탄소를 시간대별로 모니터링 하고 그림으로 나타낸다. 생분해가 진행되면서 시험군 내에서 측정되는 용존유기탄소 수준은 대조군의 수준과 가까워 질 것이다. 3 번의 연속적인 측정결과 시험군과 대조군의 차이가 일정하게 되면 측정을 3 번 더 수행한 후에 시험화합물의 생분해 백분율을 다음 식과 같이 계산한다.

$$\text{생분해도, Dt(\%)} = \frac{100 [\text{OT} - (\text{Ot} - \text{Oc})]}{\text{OT}}$$

OT : 폭기 시작 시 침전조를 거친 하수에 가해진 유기탄소로서 시험 화합물 농도

Ot : 폭기 후 시험군의 상등액 내 용존유기탄소 농도

Oc : 대조군의 상등액 내 용존유기탄소 농도

- 1.2 처음부터 대조군과 시험군 간에 차이가 없다면, 혹은 둘 간의 차이가 생분해가 일어나지 않는 것으로 예상했던 것보다 작은 수준으로 유지된다면, 생분해와 흡착을 구별하기 위한 추가적인 시험들이 필요하다. 상등액을 접종원으로 이용하여 Sturm 혹은 Closed bottle test(OECD 시험 지침서 301)를 수행할 수 있다.

2. 시험결과의 적합성

본 시험에서 20 % 이상의 용존유기탄소 감소를 야기하는 시험물질은 본질적 생분해성 물질로 간주한다. 용존유기탄소가 70 % 이상 감소되는 시험물질은 높은 생분해성이 높은 물질 (이분해성)이라고 을 가진다고 판단할 수 있다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

- 3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지
3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질

(1) 물리적 특성과 이화학적 성질

(2) 식별 정보

3.5 시험조건

(1) 시험온도, 시험노도 및 시험기간

(2) 생활하수 : 채취장소, 농도 등

(3) 절차 대조군, 대조군에 사용된 화합물

3.6 시험결과

(1) 생분해도 곡선

3.7 시험결과에 대한 고찰

(부록)

1. OECD/EEC 고리 시험에서 사용된 다양한 화합물에 대한 SCAS 시험 결과의 예

시험 화합물	OT(mg/L)	Ot-Oc(mg/L)	생분해도/생물학적 제거 백분율
4-acetyl amino- benzene sulphonate	17.2	2.0	85
Tetra propylene benzene sulphonate	17.3	8.4	51.4
4-nitrophenol	16.9	0.8	95.3
Diethylene glycol	16.5	0.2	98.8
Aniline	16.9	1.7	95.9

시험기간: 40 일

2. 사이클로펜테인 테트라 카복실레이트(Cyclopentane tetra carboxylate)에 대한 결과

OT(mg/L)	Ot-Oc(mg/L)	생분해도/생물학적 제거 백분율
17.9	3.2	81.1

시험기간: 120 일

제14항 미생물분해시험(본질적 분해성) : Zahn-Wellens/EVPA 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 본질적 분해성을 확인하기 위한 방법으로, 시험물질이 미생물에 의해 분해되기 전후 용존유기탄소량 혹은 화학적 산소 요구량의 차이를 측정하여 생분해도를 평가한다. 이 시험법은 Zahn-Wellens 시험법과 EMPA(Swiss federal laboratories for materials testing and research)에 의해 개발된 시험법에 포함된 요소들을 통합한 시험법이다.

2. 용어 정의

2.1 용존유기탄소(DOC, Dissolved Organic Carbon)

용해된 상태이거나, 0.45 μm 여과지로 여과한 상태 또는 원심분리(약 $4,000 \times g$) 후 상등액에 남아 있는 유기탄소

2.2 화학적 산소요구량(COD, Chemical oxygen demand)

고온의 산성 조건에서 중크롬산칼륨으로 시험물질을 산화시키는 동안 소모되는 산소의 양. COD는 물질 중에 산화될 수 있는 물질의 양에 대한 척도이며, 시험물질(mg)당 소모되는 산소량(mg)으로 표시. 용존상태로 존재하는 유기물을 화학적으로 분해시켜 안정화하기 위해 요구되는 산소의 양. 물의 오염상태를 표시하는 지표의 하나

II. 시험

1. 원리

시험 물질과 무기 영양소 및 활성 슬러지가 혼합된 배양액은 20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 25 $^{\circ}\text{C}$ 의 암실에서 28 일간 폭기시키면서 교반한다. 시험 물질을 포함하지 않은 대조군도 실험군과 동시에 배양을 진행한다. 일정한 시간 간격으로 채취된 시료의 DOC(또는 COD)를 측정하여 생분해성을 파악한다. 매 시간 간격 마다 공시험에 대해 보정되고 초기 DOC 값에 대한 제거된 DOC(혹은 COD)의 비율은 시료 채취 시점

에서의 생분해도(%)로서 표현된다. 생분해도와 시간을 이용하여 생분해 곡선을 작성한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치 및 기구

2.1.1 용기의 바닥보다 5 cm ~ 10 cm 윗부분에서 회전하는 불활성물질로 된 교반기가 구비된(7 cm ~ 10 cm의 긴 막대기 모양의 자석 교반기가 사용될 수 있음) 1 L ~ 5 L 부피의 원통형 유리 용기와, 용기 바닥보다 1 cm 윗부분에서 공기를 도입하기 위한 내경 2 mm ~ 4 mm인 유리관, 혹은 공기의 유입과 교반을 할 수 있도록 바닥에 프리트 글라스(Frit glass)가 갖추어진 같은 크기의 용기

2.1.2 탈지면 여과지와 물을 채운 세척병으로 여과된 압축공기 공급장치, 또는 먼지나 기름 또는 기타 유기성 불순물이 제거된 압축공기 공급장치.

2.1.3 막여과장치

2.1.4 용존유기탄소 분석기

2.1.5 용존산소 측정장비

2.1.6 원심분리기

2.1.7 pH 측정기

2.2 물

탈이온수나 증류수를 사용한다.

2.3 기초배양액을 위한 농축액

분석급 시약을 사용해서 다음과 같은 기초배양액 농축액을 조제한다.

2.3.1 농축액 A

인산이수소칼륨(KH_2PO_4)	8.50 g
인산수소이칼륨(K_2HPO_4)	21.75 g
인산수소이나트륨·2 수화물($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	33.40 g
염화암모늄(NH_4Cl)	0.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만들고 pH 7.4로 맞춘다.

2.3.2 농축액 B

무수염화칼슘(CaCl_2) 27.50 g

또는 염화칼슘·2 수화물($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 36.40 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.3 농축액 C

황산마그네슘·7 수화물($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 22.50 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

2.3.4 농축액 D

염화철(III)·6 수화물($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 0.25 g

- 물에 용해시켜 1 L가 되도록 만든다.

용액을 장기간 보관하기 위해 1 L 당 진한 염산 1 방울 또는 에틸렌다이아민사 아세트산나트륨염(EDTA disodium salt) 0.4 g을 첨가하여 보관한다. 기초배양액 원액에 침전물이 생성될 경우 새로 조제하여 사용한다.

2.4 기초배양액의 조제

기초배양액 원액 A를 10 mL 취하여 800 mL 물에 섞은 후 원액 B, C, D를 각 1 mL씩 첨가하고 물로 1 L가 되도록 만든다.

2.5 표준물질

활성슬러지의 생분해 능력 및 활성을 확인하기 위해서, 생분해성이 알려져 있는 표준물질을 사용하는 시험이 각 시험마다 병행되어야 한다. 표준물질로는 에틸렌 글리콜(Ethylene glycol), 디에틸렌 글리콜(Diethylene glycol), 라우릴 술포네이트(Lauryl sulfonate), 아닐린(Aniline) 등을 사용한다.

2.6 시험병의 준비

시험병 1,2 : 기초배양액 + 접종원 + 시험물질 [시험 물질군]

시험병 3,4 : 기초배양액 + 접종원 [접종원 바탕시험군]

시험병 5 : 기초배양액 + 접종원 + 표준물질 [절차 대조군]

2.6.1 최종 부피에서 시험물질은 50 mg ~ 400 mg DOC/L(100 mg ~ 1,000 mg COD/L), 접종원은 0.2 g ~ 1.0 g 건조중량/L에 도달하도록 적절한 수의 시험병에 500 mL 기초배양액과 시험물질 및 접종원을 도입한다. 접종원과 시험물질 간의 비율이(DOC로서) 2.5 : 1에서 4 : 1 사이에 있도록 한다. 기초배양액을 이용하여 실험에 필요한 부피로 만든다. 최종 부피는 1 L ~ 5 L이며, DOC 혹은 COD 측정을 위해 채취되는 시료의 수와 분석 절차에 필요한 부피에 따라 결정되며, 보통 2 L를 사용한다.

2.6.2 활성슬러지와 기초배양액을 함유한 같은 부피의 공시험 시료를 한두 개 준비한다.

2.6.3 각 시험마다 절차 대조군으로서 시험물질 대신 표준 화합물 중 하나를 사용한 한 개의 시험병을 병용한다. 만약 비생물학적 분해에 대한 정보가 필요하다면, 시험물질의 멸균 비접종 용액(Sterile uninoculated solution)을 준비한다.

2.7 시험조건

2.7.1 시험물질의 농도 : 용존유기탄소로 50 mg/L ~ 400 mg/L, 화학적 산소요구량으로 100 mg/L ~ 1,000 mg/L

2.7.2 접종원(활성슬러지)농도 : 건조중량 0.2 L ~ 1.0 g/L

2.7.3 시험온도 : 20 °C ~ 25 °C

2.7.4 pH : 6.5 ~ 8.0 [필요하면 NaOH (40 g/L)나 H₂SO₄ (50 g/L)로 조절]

2.7.5 시험기간 : 28 일

3. 시험방법

3.1 접종원의 채취 및 배양

3.1.1 채취

접종원으로는 생활하수를 처리하는 시설에서 유래된 것을 이용한다. 폐수의 BOD₅는 25 mg/L보다 작아야 한다.

3.1.2 채취횟수

다음의 시기에 채취한 시료에서 DOC 혹은 COD를 측정한다.

(1) 시험물질을 가한 후 3 시간 ± 30 분

(2) 1 일차 ~ 27 일차 사이에 적어도 4 번 이상

(3) 27 일차와 28 일차에 채취, 28 일보다 짧은 시간에 정체기에 이른다면 그 시험의 마지막 2 일에 채취

3.1.3 운반

채취한 접종원 시료를 용기에 넣고 공기를 공급하면서 운반한다.

3.1.4 접종원의 배양 및 슬러지의 활성화

채취한 활성슬러지 시료를 기초배양액이나 수돗물로 두 번 세척한다. 슬러지를 1,000 g에서 3 분 ~ 5 분간 원심분리하거나 침전시킴으로써 분리한다. 가능한 많은 다른 종과 계통을 얻기 위해서, 특별한 경우에는 다른 장소에서 채취한 시료들을 섞고 혼합물을 위의 방법과 같이 처리한다. 시료 채취 후 6 시간 내에 슬러지를 사용해야 하는데, 그렇지 않을 경우에는 이를 기초 배양액에 분산시키고 필요할 때까지 공기를 공급한다. 표준물질을 이용한 절차 대조군으로 슬러지의 활성을 점검해야 한다.

3.2 생분해도 시험

3.2.1 슬러지 현탁액(시험물질군, 접종원 바탕시험군, 절차 대조군)의 시료를 채취하는 즉시 여과하고 여과액의 처음 5 mL는 버린다. 세척된 종이 여과기 혹은 막 여과기를 조심스럽게 사용하는데, 이들은 유기 화합물을 방출하지도 않고 흡수하지도 않는 것이 적합하다. 그렇지 않다면 막을 탈이온수 혹은 증류수로 60 °C에서 3 번 세척하고 물 속에 보관한다. 여과하기 어려운 슬러지들은 원심분리나 다른 적합한 분리 기술에 의해 분리한다.

3.2.2 시료는 일정시간 간격으로 분석가능한 최소량을 채취하며 동일한 시간에 두 번 채취된 시료를 여과 또는 원심분리하고, DOC 혹은 COD를 적절한 방법을 이용하여 측정한다. 1 차 생분해가 뒤따랐다면 DOC나 COD에 추가로 UV 분광분석과 같은 구체적인 분석법을 사용한다. 여과액을 시료 채취 당일 분석할 수 없다면 2 °C ~ 4 °C에서 최대 48 시간 동안 보관할 수 있으며, 더 오랜 시간 시료를 보관해야 한다면 영하 18 °C에서 보관한다. 그러나 가능하다면 장기간 보관하는 것은 피해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 다음을 이용하여 t 시간에서의 생분해도(%)를 계산한다.

$$\text{생분해도, } D_t(\%) = \left[1 - \frac{C_t - C_B}{C_A - C_{BA}} \right] \times 100$$

D_t : 시간 t에서의 생분해도(%)

C_A : 배양 3 시간 \pm 30 분 후에 측정된 시험 현탁액 내의 DOC 혹은 COD 농도 (mg/L)

C_t : 시간 t에서 시험물질군의 DOC 혹은 COD 평균 농도(mg/L)

C_{BA} : 배양 3 시간 \pm 30 분 후에 측정된 접종원 바탕대조군의 DOC 혹은 COD 평균농도(mg/L)

C_B : 시간 t에서 접종원 바탕대조군 내의 DOC 혹은 COD 평균농도(mg/L)

1.2 표준물질에도 동일한 계산을 수행한다.

1.3 생분해도 곡선을 그래프로 나타내고, 데이터시트에 모든 결과를 기록한다.

2. 시험결과의 적합성 및 해석

2.1 절차 대조군이 표준 화합물을 14 일 내에 최소한 70 % 이상을 제거하고 시험 현탁액 내의 DOC(혹은 COD)의 제거가 며칠 혹은 몇 주에 걸쳐 점진적으로 일어날 때 그 시험은 적합한 것으로 간주한다.

2.2 이화학적 흡착이 발생한 경우에는 시험 물질의 초기주입량, 접종 이전의 시험 물질 농도, 시험 시작 3 시간 후의 측정값을 통하여 흡착에 대한 정보를 얻을 수 있다. 생분해와 흡착에 의한 시험물질의 감소를 파악하기 위하여, 추가적인 시험을 수행해야 한다. 슬러지 상등액을 이용하는 이분해성 시험법을 권장한다.

2.3 시험물질이 박테리아의 성장과 대사를 방해하는 경우에는 시험물질의 제거율이 0이거나 매우 작을 수 있다. 시험물질에 대한 박테리아의 대사 방해 시험을 수행하지 않았다면, 관련 시험을 실시하여 대사 방해를 제거할 수 있는 수단을 강구한다.

2.4 본 시험법은 표준물질을 사용한 고리 시험에서 우수한 재현성을 보였으므로 표준물질을 사용한 시험결과와의 비교를 통해 시험 결과의 재현성 및 신뢰성을 확보할 수 있다.

3. 시험결과의 보고

결과보고서에는 다음의 사항을 기재한다.

3.1 시험실시기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

3.3 시험개시일 및 종료일, 시험기간

3.4 시험대상물질 :

(1) 물리적 특성과 이화학적 성질

(2) 식별정보

(3) 순도

3.5 시험조건 :

(1) 접종원 : 채취장소, 농도, 순응 상태

(2) 절차 대조군, 대조군에 사용된 화합물

(3) 난용성 물질의 용해방법

3.6 시험결과 :

(1) 생분해곡선

(2) 독성평가

(3) 지수식 시험 수행 X 일 후 생분해도 : 28 일 또는 28 일 이전에 시험물질이 완전히 분해되었다면, 시험물질이 검출된 마지막 날짜를 기준으로 계산된 생분해도

(4) 활성슬러지에 흡착된 시험물질량: 시험 초기의 시험물질량과 시험시작 3 시간 후 측정된 시험물질량과의 차이

(5) 생분해 곡선으로 확인되는 순응기(일), 생분해기(일), 그리고 x 일 후에 도달한 생분해 종말점

3.7 시험결과에 대한 고찰

제5장 건강영향 시험분야

제1항 급성 경피독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 동물의 피부에 시험물질을 24 시간 동안 도포한 후 나타나는 급성독성 영향에 관한 정보를 얻는 데 그 목적이 있다.

2. 정의

2.1 급성 경피독성

시험물질을 피부에 1 회 도포하고 24 시간 동안 지속적으로 노출시킨 후 단시간 이내에 나타나는 악영향

2.2 용량

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 체중 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.3 빈사상태

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.4 예측사망

실험이 종료되기 전의 어떤 시점에서 일정 시간 경과 후 사망할 것으로 보이는 임상적 징후를 가진 상태. 예, 사료나 음용수에 다가갈 수 없을 정도로 독성이 심각한 상태

2.5 GHS(globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 조화된 화학물질 및 혼합물질의 분류 체계

II. 시험

1. 고려사항

실험동물의 사용을 최소화하기 위해 평가대상 시험물질의 잠재적 급성 경피독성의 발현 가능성과 관련되는 모든 자료를 분석한 후 꼭 필요한 경우에만 시험을 수행한다. 사망할 것으로 예측되는 용량은 투여하지 않으며 부식성 또는 심각한 자극성이 있어 실험동물에게 현저한 고통을 초래할 것으로 예측되는 경우에는 시험물질을 투여하지 않도록 한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

2.1.1 동물종의 선택

성숙한 암컷 랫드를 사용한다. 특정 시험물질이 수컷에 더욱 민감하다는 자료가 있을 경우 수컷을 사용하며 이 경우에는 관련된 근거를 제시한다. 암컷은 수태경험이 없고 임신하지 않은 상태여야 한다. 투여 시 8 주령 ~ 10 주령의 200 g ~ 300 g 체중범위가 적당하다. 순화 시에는 여러 마리를 하나의 케이지에서 유지하지만, 시험물질 도포 후에는 마리 당 개별 케이지에 유지한다.

2.1.2 사육 및 급이조건

동물실의 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 30 % ~ 70 %로 유지한다. 조명은 인위적으로 조정할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 일반 실험용 사료를 제공하며 음용수는 자유롭게 마실 수 있게 한다. 실험동물은 최소 5 일 전부터 실험조건에 순화시킨다.

2.2 시험물질

시험물질이 액체인 경우는 일반적으로 희석하지 않고 사용하며 고체인 경우 분말상태로 하여 피부와 잘 접촉할 수 있도록 물 또는 적당한 용매를 사용하여 충분히 습윤시킨다. 용매는 수용성 용액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 피부에 미치는 영향을 고려하여야 한다. 사용한 용매의 부피(0.5 mL ~ 1.0 mL이면 충분)는 기록한다.

3. 시험방법

3.1 원리

시험물질을 피부에 도포한 후 사망 여부 및 독성반응을 관찰한다. 본시험에 적용할 시작용량을 설정하기 위해 예비시험을 실시하며 독성정보가 충분하지 않은 경우에는 일반적으로 200 mg/kg 용량을 시작용량으로 설정한다. 본시험의 시작용량은 예비시험 결과에 근거하여 선정하는데 사망과 같은 심각한 독성을 유발하지 않으나 그 외의 독성 증상이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다. 시작용량의 결과에 따라 이 보다 고용량 또는 저용량을 선택한 후 다음 단계의 시험을 시작한다. 사망 또는 독성반응의 결과에 따라 별표에 제시된 GHS 카테고리 결정한다.

3.2 시험물질의 투여 및 용량

3.2.1 사전준비

- (1) 실험동물은 시험물질 도포 전에 총 체표면적의 최소 10 %에 해당하는 면적에 제모하며 일반적으로 등 또는 옆구리 부위에 실시한다.
- (2) 투여부위 전체에 시험물질을 균일하게 도포하여야 하며 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나 가능한 도포부위 전체를 균일한 필름 상태로 넓게 도포한다. 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 시험물질이 24 시간 동안 피부와 잘 접촉할 수 있도록 도포한다.
- (3) 시험물질 도포 부위는 시험물질과 거즈 봉대를 유지시키기 위하여 적당한 방법으로 다시 덮어주어 동물이 시험물질을 섭취하지 못하도록 해야 한다. 시험물질의 섭취를 방지하기 위해 보조 장비를 사용할 수 있으나 동물을 완전히 움직이지 못하게 하는 것은 좋지 않다. 투여 종료 시에 남아있는 시험물질은 물이나 적당한 용매를 사용하여 제거한다.
- (4) 각 동물 당 시험물질의 투여는 독성의 정도에 따라 차이는 있으나 최소 48 시간 이상의 간격을 두고 진행하도록 한다. 전 단계의 투여 용량에서 실험동물의 생존에 대한 확신이 들기 전에 다음 단계의 용량을 투여하지 않아야 한다. 동물에 대한 독성관찰은 최소 14 일간 진행한다.

3.2.2 예비시험

- (1) 본시험의 시작용량을 결정하기 위한 예비시험에서는 200 mg/kg 용량을 우선 선정하여 랫드 한 마리에 투여한다. 별표에 제시된 흐름도에 따라 200 mg/kg에서 사망하는 경우 저용량(50 mg/kg)을 투여하며, 사망하지 않은 경우 고용량(1,000 mg/kg, 2,000 mg/kg)을 투여한다.
- (2) 별표에 제시된 바와 같이 50 mg/kg에서 사망한 경우 시험물질의 GHS 분류는 카테고리 1로 하며 사망하지 않은 경우 본시험의 용량은 200 mg/kg으로 정한다. 1,000 mg/kg에서 사망한 경우 본시험의 용량은 200 mg/kg으로 정하며, 2,000 mg/kg 용량에서 사망하는 경우 본시험의 용량은 1,000 mg/kg으로 하고 사망하지 않은 경우에 본시험의 용량은 2,000 mg/kg으로 정한다.

3.2.3 본시험

- (1) 예비시험의 결과를 토대로 설정한 시작용량을 2 마리의 동물에 투여하고 이때 나타난 독성반응 및 사망여부를 관찰한다.
- (2) 관찰결과로서 투여된 용량에서 2 마리 모두 사망하는 경우, 한 마리 사망하는 경우, 그리고 독성의 증거가 나타나지 않거나 사망하지 않은 경우로 구분한다.
- (3) 2 마리 모두 사망하는 경우 저용량 단계의 시험을 실시하며, 독성의 증거가 없거나 사망하지 않은 경우에는 고용량 단계의 시험을 실시한다. 1 마리만 사망하는 경우 별표에서 제시된 GHS 카테고리를 확인하고 정한다.
- (4) 본시험에서의 고정용량은 50 mg/kg, 200 mg/kg, 1,000 mg/kg 그리고 한계용량으로서 2,000 mg/kg 등 4 단계의 용량이 있다.

3.3 일반증상 관찰

- (1) 관찰은 보통 14 일간 실시하며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변동될 수 있다. 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 1번 관찰하고, 24 시간 마다 주기적으로 실시한다. 특히 투여 후 처음 2 시간 ~ 6 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다. 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은

매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록하고, 기록은 개체별로 수행한다.

(2) 빈사상태에 있거나 극심한 통증과 고통에 시달리는 동물은 즉시 인도적으로 치사시킨다. 인도적으로 치사시키거나 사망한 동물에 대해서는 사망시간을 가능한 정확히 기록한다.

(3) 또한, 시험물질을 제거한 후 24 시간, 48 시간, 72 시간에 도포부위를 Draize 기준에 따라 관찰할 수 있다. 이 자료는 별도의 생체 내 피부 자극성시험의 면제 여부에 대한 유용한 자료가 될 수 있다.

(4) 피부와 털, 눈과 점막, 호흡기, 순환기, 자율 신경계 및 중추 신경계, 전신 운동 활동 및 행동 패턴을 포함하여 동물의 증상을 관찰한다. 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면 및 혼수상태에 대한 관찰은 특별한 주의를 기울여야 한다.

3.4 병리검사

모든 동물은 부검을 실시해야 하며 육안으로 관찰되는 모든 병리적 소견을 기록한다. 24 시간 또는 그 이상 생존한 동물의 경우, 육안적 병리소견을 나타내는 기관에 대해서는 필요시 현미경 검사를 실시한다.

3.5 체중

체중은 시험물질을 투여하는 날(또는 투여 직전) 개체별로 측정하며, 이 후 최소 주 1 회 이상 측정한다. 시험이 종료되는 시점까지 생존한 동물은 체중을 측정한 후 인도적으로 치사시킨다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 시험결과는 개별 동물마다 제시한다. 시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.
- (2) 별표에 제시된 GHS 분류 카테고리를 결정한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서에는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 생체 내(*in vivo*) 시험을 수행해야만 하는 논리적 근거

- 기존 시험자료에 대한 가중치 분석

2.2 시험기관의 명칭 및 소재지

2.3 시험책임자 및 담당자 성명

2.4 시험동물

종/계통, 성별, 동물의 수, 주령, 공급처, 사육조건

2.5 시험물질

물질명과 CAS 번호, 공급처, 로트번호, 안정성, 순도, 불순물, 용매에서의 용해도 및 안정성, 외관, 시험과 관련된 물리화학적 성질

2.6 용매 및 선정사유

2.7 시험조건

시험물질에 대한 사항, 투여방법, 도포부위, 투여용량 및 부피, 노출기간, 시작용량의 선정 근거

2.8 시험결과

(1) 개별동물의 용량별 독성반응 결과

사용 동물 수, 체중변화, 사망 및 부검 동물 수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화기, 호흡기, 순환기, 중추 신경계에 나타나는 독성증상(행동 패턴, 경련, 설사, 타액 분비, 혼수상태 등), 도포부위의 자극성

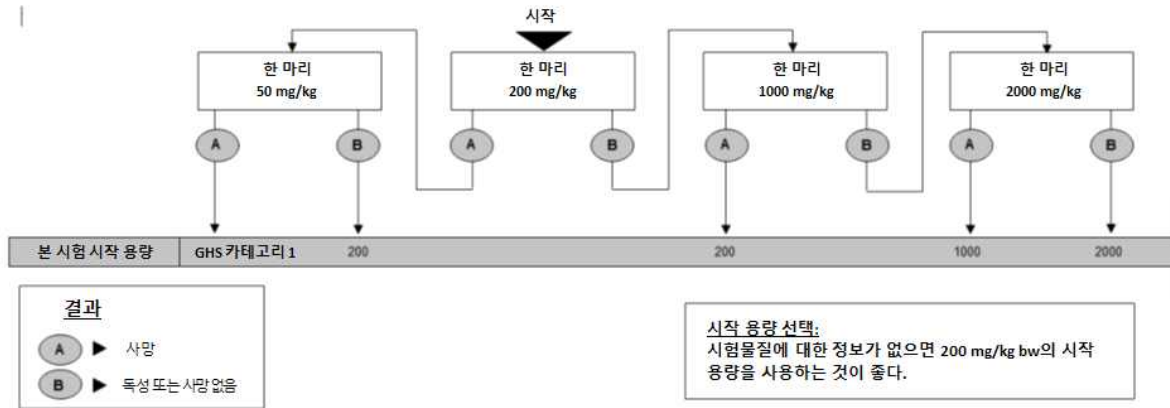
(2) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

(3) 안락사 기준 및 근거

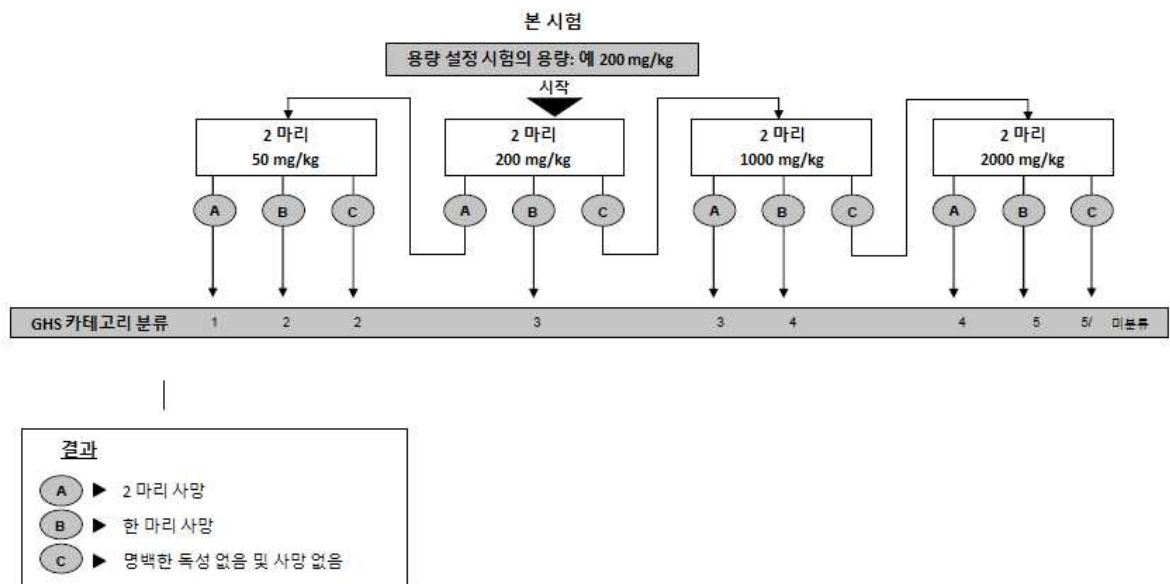
(4) 부검 결과

(5) 결과의 해석

별표
시험 절차를 위한 흐름도
예비시험



본시험



제2항 급성 흡입독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 흡입 가능한 물질(가스, 휘발성 물질 또는 입자상 물질)에 단기간 노출되었을 때 나타날 수 있는 건강장해를 평가하는데 그 목적이 있다. 이 시험 방법으로 얻은 결과는 시험 물질의 분류와 표시를 위한 기초자료로 이용될 수 있으며 아급성과 기타 독성시험에 대한 농도를 설정하는데 이용될 수 있다.

2. 용어 정의

2.1 급성 흡입독성

흡입 가능한 물질을 단기간(24 시간 이내)에 1 회 흡입 노출시켰을 때 시험물질에 의해 나타나는 유해영향

2.2 LC₅₀

시험물질에 노출 후 일정시간 또는 노출 중에 시험동물의 반수를 사망시킬 수 있는 물질의 농도. 단위는 공기의 표준부피당 시험물질의 무게(mg/mL) 또는 ppm으로 표시

II. 시험

1. 원리

몇 개의 군으로 나눈 시험동물에 시험 물질을 단기간에 1 회 노출시킨 후 다양한 독성 영향, 반응 또는 사망 등에 대한 관찰을 하며, 시험 중에 사망한 동물은 부검하고 시험 종료 시까지 생존한 동물은 부검한다. 극심한 통증 또는 지속적인 고통과 통증의 징후를 보이는 동물들에 대해서는 인도적으로 안락사시키고 부검한다. 부식성 또는 자극성으로 인해 시험동물에게 고통을 유발시키는 것으로 알려진 시험물질은 본 시험을 수행하지 않는 것을 원칙으로 한다. 노출환경

중에서의 적절한 농도를 유지하기 위하여 용매를 사용하는 경우에는 용매 노출 균을 설정해야 한다.

2. 시험의 준비

2.1 예비사항

건강하게 성숙한 동물을 시험 전에 적어도 5 일간 시험환경에 순화시킨 후 시험 시작 전에 동물을 무작위로 그룹을 나눈다. 시험물질의 분산농도를 조정하기 위하여 필요한 경우 적당한 용매를 사용할 수 있다. 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 장치

19 %의 산소농도와 시험물질의 분산농도가 균일하게 유지되는 노출환경을 유지하는 것이 가능하고 시간당 12 회 ~ 15 회의 환기가 유지되도록 고안된 흡입장치(챔버)를 사용한다. 챔버 내를 약간 음압으로 유지시켜 시험물질이 누출되지 않도록 한다. 챔버를 사용하는 경우는 시험동물이 밀집하여 있는 상태를 최소한으로 하여, 시험물질의 노출이 최대로 유지되도록 한다. 챔버 내 환경의 안정성을 확실하게 유지하기 위해 사용동물의 총용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 하는 것이 좋다. 다른 방법으로서 입, 비부노출, 두부노출, 전신챔버노출법 등을 사용할 수가 있다.

적절한 농도분석 및 조절 장치를 부착시킨 흡입장치를 사용하여야 한다. 장치 내 전체의 노출조건이 본질적으로 동일하게 유지되도록 공기의 유량을 조정해야 한다.

2.3 시험동물

(1) 동물종의 선택

건강하고 성숙한 동물을 사용하며 여러 종류의 포유동물을 사용할 수 있다. 바

람직한 종은 랫드이며 일반적으로 실험실에서 사용되는 계통을 사용하도록 한다. 군분리 시 동물은 8 주령 ~ 12 주령의 동물을 사용한다. 시험에 사용하는 동물 개체 간 또는 군 간의 체중변동은 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.

(2) 동물 수 및 성별

각 농도군에 적어도 10 마리(암컷 5 마리, 수컷 5 마리)를 사용한다. 암컷은 임신이나 출산의 경험이 없는 동물을 사용해야 한다.

(3) 사육 및 급이조건

시험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 $30\% \sim 70\%$ 를 반드시 유지시킨다. 인공조명으로 할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰이는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 동물은 성별 군으로 사육해야 하며, 케이지 당 동물 수는 개개의 동물을 충분하게 관찰할 수 있는 범위로 한다.

각 동물에 고유한 식별 번호를 무작위로 부여한다. 시험물질의 생물학적특징이나 독성 영향(병적 상태, 민감성)에 따라서 개별적인 사육이 필요할 수 있다. 비부 노출은 동물의 체온과 분당 호흡량 등의 생리적인 한계점에 영향을 나타낼 수 있으므로, 비부로 노출시키는 동물은 순화기간 동안 노출홀더에 대한 적응훈련이 필요하다.

2.4 시험조건

(1) 노출농도

시험물질의 노출농도는 충분한 단계를 두도록 해야 하며 적어도 3 단계를 설정하여야 하는데, 시험군에서 독성작용이 나타나는 범위에서 농도-사망곡선이 그려지고 LC_{50} 의 산출이 가능하도록 설정하여야 한다. 시험물질이 폭발할 가능성이 있는 경우에는 폭발농도가 되지 않도록 주의한다. 적절한 노출농도를 설정하기 위하여 예비시험을 실시할 것을 권장한다.

(2) 한계시험

한계시험은 규제제한농도 이상에서 독성반응을 유발할 것으로 예측되는 시험물질에 대해서 수행한다. 한계시험은 일반적으로 암컷 및 수컷 각각 3 마리씩을 시험물질의 한계농도에 노출시킨다.

호흡 가능한 물질에 대해 가스는 실제 농도 20,000 ppm, 증기의 경우에는 20 mg/L, 에어로졸은 5 mg/L로 하고 4 시간 노출시킨다. 한계농도의 설정이 시험물질의 물리화학적 성상 때문에 불가능한 경우에는 시험이 가능한 최고농도로 설정하여 시험하고, 시험물질로 인한 사망이 발생하지 않을 경우에는 그 이상의 3 농도 단계를 사용하는 본시험을 할 필요는 없다.

(3) 노출시간

노출시간은 챔버 내의 농도가 평행을 이룬 후 적어도 4 시간 동안 수행한다. 비부 노출 시 랫드의 경우 6 시간, 마우스의 경우 4 시간을 초과시키지 않는다. 노출 시간의 연장이 필요한 경우, 이에 대한 판단 및 근거를 제시한 후 노출 시간을 변경한다.

(4) 관찰기간

관찰기간은 적어도 14 일간으로 하나 엄격히 규정된 것은 아니다. 관찰기간은 독성 반응과 증상출현율의 비율, 그리고 회복기간의 연장 등이 보일 때 결정되 필요에 따라 연장해도 좋다. 독성의 징후가 나타난 시간과 사망시간은 중요하며 특히 사망발현이 지연되어 일어나는 경향이 있는 경우에 중요하다.

3. 시험방법

3.1 시험물질 노출

노출직전에 시험동물의 체중을 측정하고, 지정한 장치에서 설정한 농도 및 기간 동안 노출시킨다. 흡입챔버내의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지해야 한다. 이상적인 상대습도는 30 % ~ 70 %로 하지만 이 조건을 실행할 수 없는 특별한 경우(시험물질의 물리화학적 특성 등에 따른 노출환경 및 측정방식의 특이성)에는 그 사유를 기술한다. 노출 중에는 먹이를 주지 않고 경우에 따라 음용수도 주지 않는다.

3.2 이화학적 측정항목

다음의 사항에 관하여 측정하거나 또는 모니터링을 실시한다.

(1) 공기의 유량

챔버에 흐르는 공기의 유량은 각각의 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 연속적으로 측정하고 기록하여야 한다. 산소농도는 최소 19 % 이상을 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

(2) 온도와 습도

노출 시간 동안 연속적인 측정 및 기록을 최소한 3 번 이상 수행하는 것이 바람직하다.

(3) 명목농도

명목농도(Nominal concentration)는 챔버에 발생된 시험물질의 총 질량을 챔버를 통과하는 공기의 총 부피로 나누어 계산하며 노출 후에는 농도를 계산하고 기록한다.

(4) 분석농도

시험물질의 분석농도는 동물의 호흡구역 내에서 측정되는 농도이며, 노출 시간 동안 각 시험의 실제 농도 측정 방법에 따라서 연속적으로 또는 주기적으로 측정되어야 한다. 노출중의 농도변동은 가능한 일정하게 해야 한다. 챔버에서의 노출되는 시험물질의 분석농도는 시험물질의 특성에 따라 중량측정법 또는 적절한 분석법을 이용한다.

(5) 입경분포

에어로졸의 입경분포는 노출 시간 동안 최소한 2 번 이상 캐스케이드 임팩터(Cascade impactor) 또는 이에 대한 대체 장비인 입자 계측기(Aerodynamic particle sizer) 등을 이용하여 측정한다. 증기 물질의 경우 응결되어 에어로졸화될 가능성이 있는데 이 경우도 입경 분포를 측정하는 것이 바람직하다. 호흡기의 전체 각 부분에 노출이 잘 이루어지도록 하기 위해, 에어로졸 입자의 크기는 입자계측기로 입경평균 $1\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m}$ 범위에서 1.5 ~ 3.0의 표준 편차 값을 나타내는 것이 바람직하다. 금속 흡은 이러한 기준치보다 낮을 가능성이 있고 대

전 입자, 섬유, 흡습성 물질(기도의 습환경에서 입경이 증가) 등의 경우에는 이 기준치보다 높을 가능성이 있다.

3.3 관찰항목

노출기간동안과 노출 종료 후에 시험동물의 일반증상을 관찰하고 그 결과를 체계적으로 기록한다. 각각의 동물에 관하여 개별적으로 관찰하고 기록하여야 한다. 적어도 매일 1 회 이상 주의 깊게 시험물질에 의한 영향을 관찰하여야 한다. 노출 당일에는 가능한 2 번 이상 관찰한다. 시험동물의 손실을 최소화하기 위하여서는 매일 주의하여 관찰한다. 사망동물은 발견한 즉시 부검하거나 냉장보존하며, 쇠약해지거나 빈사상태의 동물은 격리하거나 안락사 등 적절히 처치한다.

관찰항목은 특별히 제한을 두지는 않으나 피부, 피모, 눈, 점막, 호흡계, 순환계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동과 행동 패턴의 변화, 진전, 경련, 유연, 설사, 무기력, 수면 및 혼수, 사망 등을 포함한다. 사망시간은 가능한 한 정확히 기록해야 한다. 동물의 개별체중은 노출 후 매주 1 회와 사망 시에 측정하고 1 일 이상 생존한 경우에는 체중변화를 계산하고 기록해야 한다. 시험 종료 시 생존한 동물은 체중을 측정한 후 안락사 처분한다.

3.4 체중측정

순화기간, 노출 전, 노출 후, 관찰기간, 부검 또는 안락사 시에는 개별동물의 체중을 측정하고 기록하여야 한다. 체중 변화는 독성 발현의 주요 인자이므로, 노출 전 측정한 체중 대비 20 % 이상의 체중 감소가 관찰된 동물의 경우 주의 깊게 관찰해야 한다.

3.5 병리검사

동물의 부검은 특히 기도에 어떠한 변화를 일으켰는지 특별한 주의를 해야 한다. 다른 장기가 관여하고 있을 가능성을 보여주는 독성징후가 있는 경우에는 이들의 장기도 조사하는 한편 모든 육안적 병리변화는 기록하여야 한다. 만약 계획 부검

전에 사망한 동물이 발생되면 냉장상태로(냉동이 아닌)보관 한다. 이 때 부검은 가능한 하루나 이틀 이내로 바로 수행하여야 한다. 표적 기관의 현미경적 검사는 다양한 독성학적 정보를 제공하기 때문에 가능한 수행하는 것이 좋다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험결과는 각 군마다 시험 개시시의 동물 수, 개별동물의 사망시간, 독성징후를 나타낸 동물 수, 독성변화 및 부검소견을 표로 정리한다.

LC₅₀의 결정은 일반적으로 Bliss (1), Litchfield and Wilcoxon (2), Miller and Tainter (3), Weil (4) 등의 방법에 따라 구한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함해야 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험동물

- (1) 사육조건(케이지 당 동물 수, 깔짚, 온도, 상대습도, 광주기, 사료)
- (2) 랫드가 아닌 종을 사용할 경우 사용한 동물의 종/계통과 근거
- (3) 동물 수, 주령, 성별
- (4) 동물군 분리시의 무작위 추출 방법
- (5) 사료와 음수에 대한 세부사항(사료의 유형/구입처, 음수의 구입처)
- (6) 시험 전 조건에 대한 설명(사료, 격리, 질병 치료)

2.4 시험물질

- (1) 물리적 기원, 순도, 이화학적 성질
- (2) 식별정보 및 CAS 번호

2.5 시험용매

- (1) 용매 사용과 선정의 근거
- (2) 용매가 연구 결과를 방해하지 않음을 입증하는 과거 혹은 현재의 자료

2.6 흡입챔버

- (1) 크기 및 부피를 포함하는 흡입챔버의 설명
- (2) 사용된 장치의 설명 및 구입처
- (3) 온도, 습도, 입자크기, 분석농도를 측정하기 위한 장치
- (4) 환경공기 조정의 방법
- (5) 배기의 처리
- (6) 압력차이(양압 혹은 음압)
- (7) 비부 노출 시 챔버 당 노출구, 전신 노출 시 시험계 안의 동물의 위치
- (8) 흡입장치의 공기 유량률(Air flow rates)
- (9) 산소, 이산화탄소 측정 장치
- (10) 흡입챔버가 평형에 도달하는 데 필요한 시간(t_{95})
- (11) 시간 당 부피 변화 수
- (12) 계측 장비

2.7 노출자료

- (1) 목표 농도 선정 근거
- (2) 명목농도
- (3) 호흡구역에서의 분석농도
- (4) 공기 농도
- (5) 입자의 분포, 질량 중앙 공기역학적 직경

2.8 시험조건

- (1) 시험물질 준비의 세부사항

- (2) 시험 공기를 발생시키고 시험 공기에 동물을 노출시키기 위해 사용되는 장치에 대한 설명
- (3) 화학적 분석방법 및 검증
- (4) 시험농도 선정의 근거

2.9 시험결과

- (1) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (2) 챔버의 명목농도, 분석농도 자료
- (3) 입자 크기 및 분포 자료
- (4) 성별 및 노출농도 군마다의 성적표
- (5) 시험동물의 체중변화
- (6) 관찰되었던 장애와 이상을 포함하는 부검 및 병리조직 소견
- (7) LC₅₀ 95 % 신뢰한계
- (8) 통계학적 관계

2.10 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제3항 피부 자극성 및 부식성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 동물의 피부에 시험물질을 4 시간 동안 도포한 후 발생하는 피부의 부식과 자극의 정도를 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 피부자극

최대 4 시간 동안 시험물질의 노출에 의해 발생하는 피부의 가역적인 손상

2.2 피부부식

최대 4 시간 동안 시험물질의 노출에 의해 표피 및 진피에서 괴사가 나타나는 피부의 비가역적인 손상. 궤양, 출혈, 유혈성 딱지 및 14 일간의 관찰기간 종료시에 발현된 피부 표백, 탈모증, 흉터에 의한 탈색 등이 포함됨. 부식이 의심스러운 경우에는 조직병리 검사를 수행

II. 시험

1. 고려사항

기존의 시험 결과, 화학 구조적으로 피부 자극성과 관련이 있는 화학물질 또는 혼합물질에 대한 자료, 화학물질의 강산 또는 강염기성, 검증된 생체 외 시험(*in vitro* test) 결과를 바탕으로 화학물질의 피부 부식성/자극성을 평가한 후 피부 부식성/자극성에 대한 가능성이 있다고 판단되는 경우에 한하여 동물을 이용한 시험을 수행한다. 시험과정 중 동물이 극심한 고통이나 통증을 보이는 경우 시험을 중단하고 안락사 시킨다. 시험물질에 대한 평가는 그 내용에 준하여 기술한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

2.1.1 동물종의 선택

건강하고 어린 성체의 알비노 토끼를 사용한다. 다른 종을 사용하는 경우 타당한 사유를 제시한다.

2.1.2 동물의 준비

시험 시작 24 시간 전에 동물의 등 또는 몸통 부위의 털을 완전히 제거한다. 찰과상 등 피부 손상이 일어나지 않은 건강한 동물만을 사용한다.

2.1.3 동물 수 및 성별

초기시험에서 1 마리의 동물(암컷 또는 수컷)을 사용하고 확인시험에서 2 마리를 추가로 사용한다.

2.1.4 사육조건

토끼의 경우 동물실의 온도는 $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 적정하며, 상대습도는 50 % ~ 60 %가 최적이지만 30 % ~ 70 %도 가능하다. 12 시간의 주기로 인공조명을 점멸한다. 통상적인 실험실용 사료를 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 동물은 각 케이지에서 개별적으로 사육한다.

2.2 시험물질

시험물질이 액체인 경우에는 희석하지 않고 그대로 도포하며 고체인 경우에는 (필요한 경우 분말로 만들 것을 고려) 피부에 잘 접촉될 수 있을 정도의 최소량의 물(또는 피부 자극성이 없는 용매)에 용해시켜 도포한다. 투여량은 액체의 경우 약 0.5 mL, 그리고 고체 또는 반고체의 경우 약 0.5 g으로 한다.

3. 시험방법

3.1 원리

시험물질을 실험동물의 피부에 단일농도로 1 회 도포한다. 시험물질을 도포하지 않은 부위의 피부를 대조군으로 같음한다. 일정 시간 간격으로 자극/부식의 정도를 관찰한 후, 점수로 평가하고 세부사항을 기술한다.

3.2 시험물질의 투여

- (1) 시험물질을 실험동물의 피부(약 6 cm²)에 도포한 후 첩포로 덮고, 비자극성 테이프로 고정시킨다. 피부에 직접 바르기 불가능한 경우(액체 또는 반고체의 시험물질), 먼저 시험물질을 거즈에 적용하고 피부에 붙인다. 노출 후에는 물 또는 적절한 용매를 사용하여 시험물질을 제거한다.
- (2) 첩포는 피부에 느슨한 상태로 잘 부착되어야 하며 시험물질이 피부에 잘 접촉될 수 있도록 부착시킨다. 실험동물이 첩포를 건드리거나, 시험물질을 섭취 또는 흡입하지 않도록 조치한다.

3.3 초기시험

- (1) 기존의 독성자료 또는 생체 외(*in vitro*) 시험 자료를 분석한 결과를 바탕으로 시험물질이 부식성, 자극성 또는 GHS 미분류물질로 판정될 경우, 동물실험은 실시하지 않는다.
- (2) 그러나 동물실험이 필요하다고 인정될 경우에는 실험동물 1 마리에 대해서 3 개의 첩포를 순차적으로 서로 다른 부위에 부착하는 방식으로 실시한다.
- (3) 첫 번째 첩포를 3 분간 적용한 후 제거하고 관찰한다. 심각한 피부반응이 관찰되지 않으면 두 번째 첩포를 다른 부위에 1 시간 동안 적용한 후 제거하고 관찰한다. 피부반응이 관찰되지 않으면 세 번째 첩포를 다른 부위에 4 시간 동안 적용한 후 제거하고 관찰한다.
- (4) 3 회의 순차적 노출 후, 피부 부식이 관찰되는 경우에는 시험을 종료하고, 피부 부식이 관찰되지 않을 경우 14 일 동안 실험동물을 관찰한다.
- (5) 시험물질이 피부 부식성은 없지만 자극성이 있다고 판단되는 경우, 1 개의 시험물질 첩포를 4 시간 동안 실험동물에 적용하고 관찰한다.

3.4 확인시험

- (1) 초기시험에서 피부 부식성이 관찰되지 않는 경우, 2 마리의 실험동물을 추가로 사용하여 자극성 또는 음성 반응에 대한 확인시험을 실시한다. 각 동물에 시험물질 첩포 1 개를 4 시간 동안 적용시킨다.
- (2) 초기시험에서 피부 자극성이 관찰된 경우 확인시험을 실시하는데, 시험물질을 1 마리의 실험동물에 순차적으로 노출시키거나 또는 2 마리를 동시에 노출시킨다. 이때 시험물질 첩포 1 개를 4 시간동안 적용시킨다.
- (3) 만약 초기시험이 수행되지 않은 경우에는 실험동물 2 마리 또는 3 마리에 각각 첩포를 4 시간 동안 적용하여 시험할 수 있는데, 만약 2 마리 사용하여 2 마리 모두 같은 결과를 보이면 더 이상의 실험을 진행할 필요가 없다. 서로 다른 결과가 나올 경우에는 3 번째 실험동물을 사용하여 평가하며 애매한 경우에는 추가적으로 동물을 사용할 필요가 있다.

3.5 관찰 기간

시험기간은 시험물질 영향의 가역성 또는 비가역성을 판단할 수 있도록 충분하여야 한다. 반응의 가역성을 확인하기 위해 시험물질 노출 후 14 일 동안 관찰한다. 그러나 14 일 전에 반응 가역성이 관찰되는 경우에는 시험을 종료한다. 또한 14 일 전이라도 실험동물이 극심한 고통과 스트레스를 받는 것이 확인될 경우에는 시험을 종료한다.

3.6 일반증상관찰 및 피부반응 평가

- (1) 홍반 및 부종의 징후를 평가하기 위해, 첩포를 제거한 뒤 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간 후, 피부에 나타나는 일반증상 및 피부반응을 아래 평가표에 따라 관찰하고 반응정도에 따라 점수를 부여한다. 첩포 제거 후 72 시간에 자극성이나 부식성의 판단이 어려운 경우에는 반응의 가역성을 결정하기 위해 관찰기간을 14 일까지 연장한다.

표 1. 일반증상 및 피부 반응 평가표

홍반 및 가피 형성		부종 형성	
반응	점수	반응	점수
홍반이 전혀 없음	0	부종이 전혀 없음	0
아주 가벼운 홍반 (육안으로 거의 식별할 정도)	1	아주 가벼운 부종 (육안으로 거의 식별할 정도)	1
명확한 홍반	2	가벼운 부종(뚜렷하게 부어올라서 노출부위가 구별될 정도)	2
중간정도부터 심한 홍반	3	중간정도의 부종(약 1 mm정도 부 어올랐을 경우)	3
심한 홍반과 홍반을 평가할 수 없 을 정도의 가피 형성	4	심한 부종(1 mm 이상 부어오르고 노출부위 밖까지 확장된 경우)	4
최고점: 4		최고점: 4	

(2) 자극 반응을 평가하는 경우, 피부 손상의 가역성을 고려하여야 한다. 탈모, 과각화증, 과형성증, 박피증이 14 일 동안 지속된다면 시험물질은 자극성이 있다고 판단한다. 피부반응을 판단하기 어려운 경우 조직병리학적 검사를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 도포 완료 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 그리고 72 시간 후에 관찰되는 홍반과 부종에 관한 점수를 일반증상 및 피부 반응 평가표에 따라 표로 요약하여 나타낸다.
- (2) 피부 자극성에 대한 반응 점수는 피부 손상의 성질과 정도, 가역성, 비가역성 등에 따라 이와 결부시켜 평가한다. 점수 자체는 시험물질의 자극성을 대표하지는 않으며 참고치로서 인식되어야 하며 다른 관찰 결과와 함께 평가되어야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 표시한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 동물실험수행에 대한 타당성

- (1) 시험물질에 대한 기존의 피부 자극/부식성 시험 결과
- (2) 이전 시험으로부터 얻은 관련된 자료에 대한 설명
- (3) 시험물질과 표준물질로부터 얻은 결과를 포함한 생체 외(*in vitro*) 시험 결과

2.4 시험물질

- (1) CAS 번호, 공급처, 순도, 불순물, 제품 번호
- (2) 물리적 특성 및 물리화학적 성질(즉, pH, 휘발성, 용해도, 안정도)
- (3) 혼합물질인 경우 성분비 및 성분의 상대 비율

2.5 사용 용매

- (1) 명칭, 농도, 부피
- (2) 용매 선택에 대한 타당성

2.6 실험동물

- (1) 종/계통, 알비노 토끼 외의 동물을 사용하는 경우 그 타당성
- (2) 동물의 수, 성별
- (3) 시험 시작 시 및 종료 시 각 동물의 체중
- (4) 시험 시작 시 동물의 연령 (월령 또는 주령)
- (5) 동물의 공급처, 사육 조건, 사료 등

2.7 실험조건

- (1) 도포방법, 도포 후의 처치상황 등
- (2) 첩포 물질
- (3) 시험물질의 전처리(가온, 분쇄 등), 제조, 도포, 제거 방법 등

2.8 결과

- (1) 관찰된 시간마다 각 동물의 자극/부식 반응 점수 표
- (2) 관찰된 모든 손상에 대한 세부사항
- (3) 관찰된 자극 혹은 부식 및 조직병리학적 변화의 특성과 정도에 대한 세부사항
- (4) 피부 자극 혹은 부식 외 다른 국소 및 전신 영향

2.9 결과에 대한 고찰 및 결론

제4항 눈 자극성 및 부식성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 동물의 눈에 시험물질을 노출 시킨 후 발생하는 눈의 자극과 부식의 정도를 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 눈 부식성 물질

눈에 노출되었을 경우 눈의 비가역적 조직 손상을 초래하는 물질, 또는 다음 기준의 어느 하나에 해당하는 물질. (a) GHS 눈 자극성 카테고리 1. (b) EPA 카테고리 I 눈 자극성. (c) EU 카테고리 1

2.2 눈 자극성 물질

눈에 노출되었을 경우 눈의 가역적 변화를 초래하는 물질, 또는 다음 기준의 어느 하나에 해당하는 물질. (a) GHS 눈 자극성 카테고리 2, 2A, 2B. (b) EPA 카테고리 II, III 눈 자극성. (c) EU 카테고리 2

2.3 심각한 눈 자극성 물질

투여 후 21 일 이내에 회복되지 않는 눈 조직의 장애를 초래하는 물질, 또는 다음 기준의 어느 하나에 해당하는 물질. (a) GHS 눈 자극성 카테고리 1. (b) EPA 카테고리 I 눈 자극성. (c) EU 카테고리 1

2.4 눈 비자극성 물질

다음의 기준의 어느 하나에 해당하지 않은 물질. (a) GHS 눈 자극성 카테고리 1, 2, 2A, 2B. (b) EPA 카테고리 I, II, III 눈 자극성. (c) EU 카테고리 1, 2

II. 시험

1. 고려사항

- (1) 기존의 시험 결과, 화학 구조적으로 눈 자극성/부식성과 관련이 있는 화학물질 또는 혼합물질에 대한 자료, 화학물질의 강산성 또는 강염기성, 검증된 생체 외 시험(*in vitro*, *ex vivo* test) 결과 등을 바탕으로 화학물질의 눈 부식성/자극성을 우선 평가하고, 척추동물을 이용한 시험은 최소한으로 한다.
- (2) 생체 내 피부 부식성에 관한 자료가 없는 경우 이를 우선적으로 수행하고 그 결과를 눈 자극성/부식성 시험 수행에 참고한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

2.1.1 동물종의 선택

건강하고 어린 성체의 알비노 토끼를 사용하고, 다른 종을 사용하는 경우 타당한 사유를 제시한다.

2.1.2 동물의 준비

실험시작 24 시간 전에 미리 눈 검사를 실시하여 눈 손상이나 각막 손상 등이 없는 건강한 개체를 사용한다.

2.1.3 동물 수 및 성별

초기시험에서 1 마리의 동물(암컷 또는 수컷)을 사용하고 확인시험에서 2 마리를 추가로 사용한다.

2.1.4 사육조건

토끼의 경우 동물실의 온도는 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 가 적정하며, 상대습도는 50 % ~ 60 %가 최적이지만 30 % ~ 70 %도 가능하다. 12 시간의 주기로 인공조명을 점멸한다. 통상적인 실험실용 사료를 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 동물은 각 케이지에서 개별적으로 사육한다.

3. 시험방법

3.1 원리

실험동물에 진통제를 피하 주사로 투여하고 눈에 국소 마취제를 적절하게 투약한 후 시험물질을 한쪽 눈에 1 회 투여한다. 이때 시험물질을 투여하지 않은 다른 쪽 눈을 대조군으로 사용한다. 눈의 자극성/부식성의 정도는 결막, 각막, 홍채의 손상 정도를 별표에 제시된 점수로 평가한다. 그 외에도 눈에 나타나는 다른 영향 및 전신 영향을 기술한다. 관찰 기간은 시험물질의 영향에 대한 가역성 또는 비가역성을 평가하기에 충분한 기간으로 한다.

3.2 시험물질 및 투여량

3.2.1 액체물질

시험물질이 액체인 경우는 0.1 mL를 직접 점안한다.

3.2.2 고체물질

시험물질이 고체, 반고체, 입자형태인 경우 부피로는 0.1 mL, 중량으로는 100 mg을 초과하지 않도록 투여한다. 덩어리 물질은 미세분말로 갈아서 사용하며, 고체의 부피는 미세분말을 충분히 가라앉힌 상태에서 측정한다.

3.2.3 에어로졸

- (1) 시험물질이 에어로졸(분무상태)인 경우 눈에서 약 10 cm 거리에서 눈의 손상이 야기되지 않도록 주의하면서 1 초간 분무한다. 분무기의 거리는 분무 상태에 따라 다를 수 있으나 분무압에 의해 눈의 손상이 발생하지 않아야 한다.
- (2) 에어로졸의 농도는 흡수지 앞에 토끼 눈 크기의 구멍이 뚫린 종이를 대고 분무한 후 흡수지의 무게 변화로 측정한다. 휘발성이 강한 물질인 경우 휘발이 방지되는 별도의 용기에 같은 방식으로 분무하고 용기의 무게 변화로 측정한다.

3.3 시험절차

3.3.1 전신 진통제 및 국소 마취제의 사용

시험과정에서 실험동물에 통증 및 극심한 고통을 주지 않거나 최소화하기 위해 시험책임자 또는 실험동물 수의사의 판단 및 처치에 따라 진통제와 마취제를 투약할 수 있으며 아래의 절차를 참고하여 투약할 수 있다.

- (1) 필요 시 시험물질 투여 60 분 전에 전신 진통제를 피하 주사한다.
- (2) 이후 시험물질 투여 5 분 전에 눈의 국소 마취제(예, 0.5 % proparacaine hydrochloride 또는 0.5 % tetracaine hydrochloride)를 1 방울 ~ 2 방울을 각각의 눈에 점안한다. 통증을 심하게 초래할 것으로 예측되는 시험물질인 경우에는 시험을 수행하지 않아야 하지만 통증이 의심스럽거나 꼭 시험을 수행할 필요가 있는 경우에는 시험물질을 투여하기 전 5 분 간격으로 마취제를 투약한다.
- (3) 시험물질 투여 8 시간 후에 meloxicam 등 적절한 진통제를 적절한 시기에 투약하여 시험기간 동안 진통효과를 유지하도록 한다.

3.3.2 시험물질 투여

시험물질은 한쪽 눈에만 투여하며 아래 눈꺼풀을 잡아당긴 후 결막낭에 떨어지도록 하고 시험물질의 손실을 예방하기 위해 눈꺼풀을 약 1 초간 계속 잡고 있도록 한다. 다른 쪽 눈은 시험물질을 투여하지 않으며 대조군으로 사용한다.

3.3.3 시험물질 세척

- (1) 시험물질은 최소 24 시간 동안 노출시키며 투여 후 24 시간 후에 씻어낼 수 있다. 다만, 투여 후 바로 부식성 또는 자극성이 나타나는 경우는 그러하지 않으며 고체물질인 경우, 투여 후 1 시간 후의 관찰시점에도 눈의 생리적 작용에 의해 제거되지 않고 남아 있으면 생리식염수나 증류수로 씻어낸다.
- (2) 세척 시간을 비롯하여 세척액의 조성, 온도, 세척기간, 부피, 적용속도 등은 상세히 기록해야 한다.

3.3.4 초기시험

- (1) 실험동물은 1 마리를 사용한다. 두 번째 동물에 대한 확인시험을 실시하기 전에 눈 손상의 정도, 가역성 등을 결정하기 위해 주의 깊게 관찰한다.
- (2) 시험결과 부식성이나 심한 자극성이 관찰되지 않으며 자극성에 대한 더 이상의 실험은 진행하지 않는다.

3.3.5 확인시험

- (1) 초기시험에서 부식성이나 심한 자극성이 관찰되지 않으면, 자극성 또는 음성

반응을 확인하기 위해 추가로 2 마리까지 실험을 실시해야 한다.

(2) 초기시험에서 자극성이 나타나면 확인시험을 실시하는데 이때 각 동물에 대해 순차적으로 시행한다. 두 번째 동물에서 부식성이나 심각한 자극성이 나타나면 실험을 더 이상 진행하지 않는다.

3.4 관찰 기간

시험물질에 의한 영향의 정도와 가역성을 확인할 수 있는 충분한 기간 동안 관찰을 해야 하며 보통 21 일 동안 관찰한다. 21 일 전에 가역성이 관찰되면 그 시점에 실험을 중단하며 또한 실험동물이 심각한 통증이나 극심한 고통을 느낄 경우에는 바로 중단한다.

3.5 일반증상관찰 및 눈 반응 평가

(1) 시험물질 투여 1 시간 후에 눈 손상의 존재여부를 확인하기 위해 광범위하고 포괄적인 평가를 수행하며, 이후에는 매일 평가를 수행한다. 시험을 조기에 적절히 종료할 수 있을지 결정하기 위해, 처음 3 일간은 하루에도 수차례 평가를 수행한다. 평가의 회수는 일반증상의 발현 정도에 따라 적절히 결정한다.

(2) 실험동물이 통증 및 극심한 고통(예, 발로 긁는 동작 또는 눈을 비비는 동작을 반복, 과도한 눈 깜박임, 과도한 눈물 흘림 등)을 나타내는지 확인하기 위해 시험 기간 동안 매일 관찰한다. 통상적으로 최소 하루 2 회, 최소 6 시간 간격으로 수행하며 필요 시 그 이상 실시한다.

(3) 눈 손상의 평가에는 시험물질의 성상 및 특징에 따라 플루오레세인 염색(fluorescein staining)을 실시할 수 있으며, 필요 시 검안경을 사용하도록 한다. 관찰된 눈 손상에 대한 전자사진 작업을 수행할 수도 있다.

(4) 시험물질 투여 후 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간에 별표 1에 제시된 내용을 근거로 결막, 각막, 홍채의 손상 정도를 구분하고 점수를 부여한다. 손상의 정도나 상태를 파악하고, 가역성 또는 비가역성을 결정하기 위해 최소한 1 시간, 24 시간, 48 시간, 72 시간, 7 일, 14 일, 21 일에 관찰을 실시하고 기록한다.

(5) 매 관찰 시 마다 검사결과를 구분하여 점수를 부여하고 기록하며, 눈에 나타난 기타 손상 [예, 파누스, 착색, 전안방(前眼房)변화 등]도 기록해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 해석

(1) 눈 자극성에 대한 반응점수는 눈 손상의 성질과 정도, 가역성, 비가역성 등에 따라 이와 결부되어 평가되어야 한다. 점수 자체는 시험물질의 자극성에 대한 절대적인 표준이 아니다. 이는 참고치로 인식되고 다른 관찰 결과와 함께 평가되어야 한다.(별표 1)

(2) 눈 자극성에 대한 동물실험결과를 사람에게 적용할 경우 그 유효성이 제한적일 수 있다. 알비노 토끼는 사람보다 더 민감하다. 자료 해석에 있어서 2 차 감염에 의한 눈 자극성이 발생할 경우를 배제하도록 주의해야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 표시한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 동물실험수행에 대한 타당성

- (1) 시험물질에 대한 기존의 눈 자극성/부식성 및 피부 자극성/부식성 시험결과
- (2) 이전 시험으로부터 얻은 관련된 자료에 대한 설명
- (3) 시험물질과 표준물질로부터 얻은 결과를 포함한 생체 외(*in vitro*) 시험 결과

2.4 시험물질

- (1) CAS 번호, 공급처, 순도, 불순물, 제품 번호
- (2) 물리적 특성 및 물리화학적 성질(예; pH, 휘발성, 용해도, 안정성, 물과의 반응성 등)
- (3) 혼합물질인 경우 조성물의 명칭(CAS 번호), 농도
- (4) 노출 농도

2.5 사용 용매

- (1) 명칭, 농도, 부피
- (2) 용매 선택에 대한 타당성

2.6 실험동물

- (1) 종/계통, 알비노 토끼 외의 동물을 사용하는 경우 그 타당성
- (2) 동물의 수, 성별
- (3) 시험 시작 시 및 종료 시 각 동물의 체중
- (4) 시험 시작 시 동물의 연령
- (5) 동물의 공급처, 사육조건, 사료 등

2.7 마취제, 진통제

- (1) 전신 진통제 및 국소 마취제의 노출 농도, 투여시간
- (2) 국소 마취제를 사용한 경우, 명칭, 순도, 형태, 시험물질과의 반응 가능성

2.8 결과

- (1) 관찰된 시간마다 점수 부여에 사용된 방법
- (2) 각 동물의 각 관찰 시점마다의 자극/부식 반응 점수 표
- (3) 관찰된 자극성과 부식성의 특정과 정도에 대한 서술
- (4) 관찰된 모든 기타 손상에 대한 서술(예, 혈관생성, 파누스 형성, 결착, 착색 등)
- (5) 눈 자극 혹은 부식 외 다른 국소 및 전신 영향, 통증과 극심한 고통 발생 여부
- (6) 전자사진, 조직병리학적 검사 결과 등(있을 경우)

2.9 결과에 대한 고찰 및 결론

별표 1. 눈 손상 구분에 따른 점수 기준

각막	점수
혼탁: 눈알의 농후한 정도(가장 농후한 지점을 관찰함)	
○ 궤양이나 혼탁이 없음	0
○ 분산 또는 밀집되어 있는 혼탁(정상적인 투명성이 약간 둔화된 것과는 다름) 홍채의 말단이 명확히 관찰됨	1
○ 반투명한 부분이 쉽게 관찰됨, 홍채의 말단이 약간 불명확함	2
○ 진주광택을 나타냄, 홍채의 말단이 관찰 안 됨, 동공의 크기가 가까스로 관측됨	3
○ 각막이 불투명, 혼탁 때문에 홍채가 관찰 안 됨	4
홍채	
○ 정상	0
○ 현저한 주름의 형성, 충혈, 종창, 각막 주위에 중등도의 충혈, 홍채는 빛에 대해 반응함(둔한 반응은 양성)	1
○ 빛에 대해 반응 없음, 출혈, 대부분 파괴	2
결막	
발적(안검결막, 안구결막에 한함: 각막 및 홍채 제외)	
○ 정상	0
○ 몇몇 혈관은 명확히 충혈	1
○ 넓은 범위가 진홍색 색조(diffuse, crimson color), 각각의 혈관은 쉽게 관찰 안 됨	2
○ 넓은 범위의 쇠고기 색조의 붉은색(diffuse beefy red color)	3
결막 부종	
부종(눈꺼풀 및/또는 순막)	
○ 부풀지 않음	0
○ 정상보다 약간 종창(순막 포함)	1
○ 안검의 부분적 외전을 동반한 현저한 종창	2
○ 눈이 반쯤 감길 정도의 안검의 종창	3
○ 눈이 반 이상 감길 정도의 안검의 종창	4

제5항 피부 과민성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 시험물질이 알레르기를 유발하는 물질인지를 확인하기 위하여 선정된 방법에 따라 피부과민성을 조사하는데 있다.

2. 정의

2.1. 피부과민성

어떤 물질에 대해 면역학적으로 매개되어 나타나는 피부 반응

2.2. 유도노출

과민상태를 유발하기 위해 시험물질을 시험개체에 실험적으로 노출시키는 것

2.3. 유도기간

과민상태를 유발하는 유도노출 후 최소한 1 주일간의 기간

2.4. 유발노출

시험대상이 과민증을 보이는지의 여부를 판단하기 위해 유도기간 후 이전에 처리한 시험대상을 시험물질에 실험적으로 노출시키는 것

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물종 및 성

일반적으로 기니픽을 사용하도록 하며, 정당한 이유가 있을 경우에는 다른 동물을 이용해도 무관하다. 암컷은 임신하고 있지 않고, 출산 경험이 없는 것을 사용한다.

1.1.2 연령

건강하고 젊은 성숙한 개체를 사용한다.

1.1.3 동물수

최소한 20 마리의 시험군과 10 마리의 대조군을 이용하여 실험한다.(재시험 시
최소한 10 마리의 시험군과 5 마리의 대조군을 이용하여 실험한다.)

2. 시험방법

2.1. GPMT(Guinea pig maximisation test)시험방법

2.1.1. 투여량

약한 피부 자극에서부터 중간 정도의 심각한 피부 자극을 일으키기 위해서, 각
유도 노출에 사용된 시험 물질을 체계적으로 잘 처리해, 최대 농도가 되도록 해
야 한다. 유발노출에 사용된 농도는 최대 비자극 투여량(Highest non-irritant
dose)이어야 한다. 동물 2 마리 혹은 3 마리를 사용하는 예비시험(Pilot study)을
통해 적절한 농도를 결정한다. 이런 목적을 위해 FCA(Freunds complete
adjuvant)로 처리한 동물을 사용하는 것을 고려해야 한다.

2.1.2. 유도 : 피내 주사

2.1.2.1. “0” 일 - 처리군

2.1.2.1.1. 피내 주사기 한 쌍이 정중선 양쪽에 놓이도록, 부피가 0.1 mL 인
피내 주사기 세 쌍을 털을 제거한 어깨 부위에 놓는다.

2.1.2.1.1.1. 주사 #1 : FCA와 물(혹은 생리 식염수)의 비율이 1 : 1(v/v)인 혼
합물질

2.1.2.1.1.2. 주사 #2 : 일정한 농도로 적절한 용매에 함유된 시험물질

2.1.2.1.1.3. 주사 #3 : FCA와 물(혹은 생리 식염수) 비율이 1 : 1(v/v)인 혼합
물질에 일정한 농도로 함유된 시험물질

2.1.2.1.2. 주사 #3에서, FCA와 혼합하기 전, 수용성 물질을 수상으로 용해시킨

다. 수상과 혼합하기 전, 지용성 혹은 불용성 물질을 FCA로 현탁시킨다. 시험물질의 농도는 주사 #2 의 농도와 같아야 한다.

2.1.2.1.3. 주사 #1과 주사 #2를 머리 근처에 서로 가깝게 놓고, 주사 #3은 시험부위의 꼬리 부분을 향하게 놓는다.

2.1.2.2. “0” 일 - 대조군

피내 주사 세 쌍을 0.1 mL 의 부피로 처리군의 부위와 같은 부위에 놓는다.

2.1.2.2.1. 주사 #1 : FCA와 물(혹은 생리적 염류용액) 혼합물의 비율이 1 : 1(v/v)

2.1.2.2.2. 주사 #2 : 희석시키지 않은 매개물질

2.1.2.2.3. 주사기 #3 : FCA와 물(혹은 생리식염수) 혼합물의 비율을 1 : 1(v/v)로 배합시킨 50 %(w/v) 매개물질

2.1.3. 유도 : 국부 도포

2.1.3.1. “5 ~ 7” 일 - 처리군 및 대조군

시험 물질이 피부 자극이 없는 경우, 국소 자극을 유도하기 위해, 국소 유도 도포하기 약 24 시간 전 털을 자르거나 깎은 후, 10 % 소디움라우릴설페이트가 함유된 바셀린을 0.5 mL씩 도포한다.

2.1.3.2. “6 ~ 8” 일 - 처리군

시험 부위의 털을 다시 깨끗하게 제거한다. 적절한 매개물질을 사용해 여과지(2 cm × 4 cm)를 시험물질로 완전히 묻힌 후, 시험 부위에 도포한 다음, 폐쇄 드레싱을 사용해 48 시간 동안 고정시킨다. 매개물질 선택에 대한 정당성을 입증해야 한다. 매개물질이 고체인 경우, 곱게 갈아, 적절한 매개물질을 만든다. 매개물질이 액체인 경우(적절한 경우), 희석시키지 않고 그대로 도포할 수 있다.

2.1.3.3. “6 ~ 8” 일 - 대조군

시험 부위의 털을 다시 깨끗하게 제거한다. 유사한 방법으로 매개물질만 시험 부위에 도포한 다음, 폐쇄 드레싱을 사용해 48 시간 동안 고정시킨다.

2.1.4. 유발: 국부 도포

2.1.4.1. “20 ~ 22” 일 - 처리군 및 대조군

처리군 및 대조군 동물의 옆구리에 난 털을 제거한다. 시험 물질을 문힌 첩포 혹은 챔버를 동물의 한 쪽 옆구리에 붙인다. 관련 있는 경우, 매개물질을 문힌 첩포 혹은 챔버(Chamber)를 다른 쪽 옆구리에 붙인다. 폐쇄 드레싱을 사용해 24 시간 동안 첩포를 고정시킨다.

2.1.5. 관찰 - 처리군 및 대조군

2.1.5.1. 첩포를 제거한지 약 21 시간 후, 유발 노출 부위의 털을 제거한다. 필요한 경우, 깎거나, 밀거나, 탈모제를 사용해 털을 제거한다.

2.1.5.2. 약 3 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 48 시간 후), 피부 반응을 관찰한 후, 아래 주어진 점수에 따라 기록한다.

2.1.5.3. 관찰을 시작한지 약 24 시간 후, 두 번째 관찰(72 시간)을 한 다음, 다시 기록한다.

시험군 및 대조군 동물을 관찰할 때, 맹검법으로 관찰(Blind reading)하는 것이 장려된다.

표. 유발 첩포 시험 반응 평가에 대한 Magnusson-kligman 점수 매기기

시험 반응	점 수
변화 없음	0
분리된 혹은 고르지 못한 홍반	1
보통 및 융합성 홍반	2
심각한 홍반 및 팽창	3

2.1.6. 재유발(Rechallenge)

첫 번째 유발 노출로 얻은 결과를 입증해야 하는 경우, 첫 번째 유발 노출 뒤 약 1 주일 후, 새로운 대조군으로 두 번째 유발 노출(즉, 재유발)을 고려해야 한다. 기존의 대조군에 대해 재유발 노출을 실행할 수도 있다.

2.1.7. 임상 관찰

유도 및 유발 노출에 의해 발생하는 조직 계통의 반응을 포함한 모든 피부 반응과 모든 이상 증상을 관찰해 기록해야 한다. 의심스런 반응을 입증하기 위해, 다른 방법(즉, 조직 병리학 검사 및 피부 주름 두께 측정법)을 실행할 수도 있다.

2.2. Buehler시험방법

2.2.1. 투여량

2.2.1.1. 약한 자극을 일으키기 위해서, 각 유도 노출에 사용된 시험 물질의 농도를 최대 농도가 되도록 해야 한다. 유발 노출에 사용된 농도는 최대 비자극 투여량(Highest non-irritant dose)이어야 한다. 동물 2 마리 혹은 3 마리를 사용하는 준비 조사에 적절한 농도를 결정할 수 있다.

2.2.1.2. 수용성 시험 물질인 경우, 물 혹은 계면 활성제의 묽은 비자극성 용액을 매개물질로 사용하는 것이 적절하다. 다른 물질인 경우, 유도와 유발 노출에 대해, 각각 80 % 에탄올/물과 아세톤이 선호된다.

2.2.2. 유도 : 국부 도포

2.2.2.1. “0” 일 - 처리군

2.2.2.1.1. 한 쪽 옆구리에 난 털을 깨끗하게 깎아 제거한다. 적절한 매개물질(매개물질 선택에 대한 정당성을 입증해야 하며, 적절한 경우, 액체 시험 물질을 희석시키지 않고 그대로 도포 가능)을 사용해, 시험용 첩포를 시험 물질로 완전히 묻혀야 한다. 시험용 첩포를 시험 부위에 붙인 후, 폐쇄 첩포 혹은 챔버 및 적절한 드레싱을 사용해 6 시간 동안 피부에 고정시킨다.

2.2.2.1.2. 시험용 첩포 시스템은 반드시 폐쇄형이어야 한다. 면 패드는 적절한 것이어야 하고, 원형 혹은 정사각형을 사용한다. 폐쇄를 확실하게 하기 위해, 적절한 억제제를 사용하는 억제 시스템이 선호된다. 포장하는 경우, 추가 노출이 필요할 수 있다.

2.2.2.2. “0” 일 - 대조군

한 쪽 옆구리에 난 털을 깨끗하게 깎아 제거한다. 유사한 방법으로 매개물질만 대조군에 사용된 부위에 도포한다. 폐쇄 첩포 혹은 Chamber 및 적절한 드레싱을 사용해, 시험용 첩포를 6 시간 동안 피부에 고정시킨다. 허위 대조군이 반드시 필요 없다는 것을 설명할 수 있는 경우, Naive 대조군을 사용할 수 있다.

2.2.2.3. “6 ~ 8” 일 및 “13 ~ 15” 일 - 처리군 및 대조군

“6 ~ 8” 일에, “0” 일 방법과 똑같은 방법으로, 같은 옆구리의 같은 시험 부위(필요한 경우, 털 제거)에 도포한 후, “13 ~ 15” 일에 다시 도포한다.

2.2.3. 유발

2.2.3.1. “27 ~ 29” 일 - 처리군 및 대조군

처리군 및 대조군의 처리하지 않은 옆구리에 난 털을 제거한다(깨끗하게 깎아서). 최대 비자극 농도에서, 적절한 양의 시험 물질이 함유된 폐쇄 첩포 혹은 Chamber를 처리군 및 대조군 동물의 처리하지 않은 뒤쪽 옆구리에 붙인다. 필요한 경우, 매개물질만 도포된 폐쇄 첩포 혹은 Chamber를 처리군 및 대조군 동물의 처리하지 않은 앞쪽 옆구리에 붙인다. 적절한 드레싱을 사용해, 첩포 혹은 Chamber를 6 시간 동안 고정시킨다.

2.2.4. 관찰 - 처리군 및 대조군

2.2.4.1. 첩포를 제거한지 약 21 시간 후, 유발 노출 부위의 털을 제거한다.

2.2.4.2. 약 3 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 30 시간 후), 피부 반응을 관찰한 후, GPMT에 주어진 점수에 따라 기록한다(“2.1.5. 관찰 - 처리군 및 대조군 “ 참조).

2.2.4.3. 30 시간의 관찰 뒤 약 24 시간 후(유발 첩포를 도포한지 약 54 시간 후), 피부 반응을 다시 관찰한 후, 기록한다.

시험군 및 대조군 동물을 관찰할 때, 어렵하여 관찰하는 것이 장려된다.

2.2.5. 재유발

첫 번째 유발 노출로 얻은 결과를 입증해야 하는 경우, 첫 번째 유발 노출 뒤 약 1 주일 후, 새로운 대조군으로 두 번째 유발 노출(즉, 재유발)을 고려해야 한다. 기존의 대조군에 대해 재유발 노출을 실행할 수도 있다.

2.2.6. 임상 관찰

유도 및 유발 노출에 의해 발생하는 조직 계통의 반응을 포함한 모든 피부 반응과 모든 이상 증상을 관찰해 기록해야 한다. 의심스런 반응을 입증하기 위해, 다른 방법(즉, 조직 병리학 검사 및 피부 주름 두께 측정법)을 실행할 수도 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부 반응을 보여주는 결과를 표에 요약해야 한다.

2. 시험결과의 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다.

2.1. 시험물질

2.1.1. 물리·화학적 특성

2.1.2. 기존 연구 결과

2.2. 매개물질

매개물질 선택에 대한 정당성

2.3. 시험동물

2.3.1. 사용된 기니픽의 계통

2.3.2. 동물의 수, 나이 및 성별

2.3.3. 공급처, 사육 조건 등

2.3.4. 시험 시작 시 및 종료 시 각 동물의 몸무게

2.4. 시험조건

2.4.1. 첩포 부위 준비 방법

2.4.2. 사용된 첩포 물질과 첩포 방법에 대한 세부사항

2.4.3. 시험에 사용될 유도 및 유발 노출 농도와 준비 조사 결과

2.4.4. 시험 물질의 조제 방법, 도포, 제거에 대한 세부사항

2.4.5. 유도 및 유발 노출에 사용된 매개물질과 시험 물질의 농도, 유도 및 유발 노출에 사용된 시험 물질의 총량

2.5. 신뢰성 검사

사용된 시험 물질, 농도 및 매개물질에 관한 정보를 포함한 가장 최근 실행된 신뢰성 검사 결과의 요약

2.6. 결과

2.6.1. 점수 산출 시스템을 포함한 각 동물의 점수

2.6.2. 효과의 특성 및 정도에 대한 세부사항

2.6.3. 모든 조직 병리학 검사 결과

2.7. 결과의 토의

기니픽 시험을 실행하기 전 스크리닝 시험을 수행하는 경우, 시험 물질과 표준 물질로 얻은 결과와 함께, 시험 절차의 세부사항을 포함한 시험에 대한 설명 혹은 참고문헌을 제시해야한다.

제6항 28일 반복경구투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류에 시험물질을 28 일 동안 반복 경구투여한 후 생체의 기능 및 형태의 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성을 평가하고, 아울러 90 일 반복 경구투여 독성시험 등 장기간의 반복투여 독성시험의 용량선택에 필요한 정보를 제공할 뿐만 아니라 잠재적인 내분비계장애물질을 선별하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 : mg/kg)로 표시

2.2 무영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리 집단 간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

2.3 위관투여법 (Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여를 하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.4 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.5 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 28 일 동안 여러 군의 동물에게 군당 1 개 용량으로 매일 경구투여하고, 투여 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물 및 생존 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 9 주령 미만의 건강한 수컷 및 분만의 경험이 없거나 수태경험이 없는 암컷을 사용 한다. 만약 다른 설치류 종을 이용하는 경우에는 그 정당성을 상세하게 입증해야 한다. 본 시험이 향후 더 오랜 기간 동안 투여되는 장기간의 독성시험에 대한 예비시험으로 시행될 경우에는 두 시험 모두 동일한 계통 및 공급처의 동물을 이용한다.
- (2) 시험동물의 암수를 구별하여 케이지 당 5 마리 이하로 군별 사육한다. 시험 시 동물의 체중 변동이 적도록 하고 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다. 동물은 고유하게 식별해야 하고, 처치 시작 전에 최소 5 일 동안 케이지에서 적응하도록 한다.
- (3) 각 투여량 별 최소 10 마리(암수 각 5 마리 이상)를 사용 하며 대조군 및 시험군에 무작위로 할당한다. 중간에 안락사 시켜 검사를 하는 경우 거기에 필요한 수를 미리 추가한다. 투여 종료 후 최소 14 일 동안, 가역성, 지속성, 또는 독성 효과의 지연 발생을 관찰하기 위해 대조군 및 상위 용량 시험군에 추가적으로 10 마리씩(암수 각 5 마리)의 회복군을 설정할 수 있다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 또는 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육 조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는

자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염 여부에 대해 정기적으로 분석하고, 보고가 끝날 때까지 사료 표본을 보유한다.

2.3 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용액/현탁액 사용이 우선적으로 권장되고, 오일이 함유된 용액/현탁액, 기타 용매 순으로 사용한다. 물 이외의 용매를 사용할 경우에는, 용매의 독성여부와 용매 내 시험물질의 안정성이 확인되어야 한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 28 일 동안 매일 투여한다. 시험물질은 위관투여법에 의해서나 사료 또는 음용수를 통해 투여된다. 위관투여법은 매일 유사한 시간에 투여하도록 한다.
- (2) 경구투여 하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g(체중)까지 허용된다. 대조군에 속하는 동물은 시험물질을 제외하고는 시험군에 속하는 동물과 동일하게 취급하며 용매를 사용할 경우 대조군은 시험군에 사용된 용매의 최고 용적 단위로 투여한다.
- (3) 최소한 3 단계의 투여 용량의 시험군과 대조군을 이용한다. 기존의 독성시험자료를 검토한 결과 1,000 mg/kg(체중)/day(일)의 투여량에서 독성 영향이 없을 것으로 판단되면 한계시험을 수행하며, 적합한 자료가 없는 경우 용량설정시험을 (동일 계통 및 구입처의 동물) 수행함으로써 사용할 투여 용량을 결정할 수 있다.
- (4) 최고용량은 독성 효과 유도를 목표로 선택하고, 최저용량은 용량 관련 반응 및 무영향관찰용량을 입증하려는 목적으로 내림차순 순서로 선택 한다. 내림차순 순서는 2 배 ~ 4 배 간격이 최적인 경우가 많고 용량 간에 아주 큰 간격(예, 10 배 공비 이상)을 사용하기보다 4 번째 시험군을 추가하는 것이 더 좋다.
- (5) 시험물질을 사료와 섞어 투여할 경우에는 일정한 사료 농도(ppm) 또는 동물의 체중을 고려한 일정한 용량을 사용한다. 위관투여법에 의해 투여된 물질은, 동물 체중을 고려한 일정 용량을 유지하기 위해 필요에 따라 조정한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg와 동등한 1 개 용량에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험은 필요하지 않으며, 사람에게 노출 시 더 높은 투여량이 사용 될 필요가 있을 때 외에는 한계시험이 적용 될 수 있다.

3.3 관찰사항

- (1) 관찰기간은 28 일이다. 일반적인 임상관찰은 최소 1 일 1 회, 매일 같은 시간에, 투여 후 예상 영향이 최대로 나타나는 기간을 고려하여 시행되어야 한다. 관찰사항은 (주 1)에 표시하였다. 동물의 임상상태는 최소 1 일 2 회, 통상 매일 시작할 때와 끝날 때 이환율과 사망률의 징후에 대해 모든 동물을 관찰하고 기록한다.
- (2) 최초 노출 전에 1 회, 그리고 그 이후에는 매주 최소한 1 회, 모든 동물에 대해 상세한 임상 관찰을 실시해야 한다. 독성 효과의 사후 관찰이 예정된 회복군 내 동물은 투여 종료 후 최소한 14 일 동안 유지되어야 한다.
- (3) 투여 마지막 주에는 행동기능검사 (Functional observation battery, FOB)를 실시한다. 여러 가지 자극에 대한 감각반응검사, 양력검사, 운동성 검사가 포함되어야 한다.
- (4) 본 시험이 90 일 반복 경구투여시험에 대한 예비시험으로 시행되는 경우 또는 독성 징후가 드러나지 않는 경우 행동기능검사는 생략할 수 있다.
- (5) 모든 시험동물의 체중은 최소 주 1 회 측정한다. 사료 및 음용수 소비량은 최소 주 1 회 측정한다.

3.4 검사항목

3.4.1 혈액학 검사

시험 종료 시 동물을 안락사하기 직전 혈액을 채취하고 적절한 조건 하에서 보관한다. 혈액 표본 추출 전 하룻밤 동안 금식시키며 시험 기간 중 혈액샘플 채취 시 다음의 항목을 검사한다. 적혈구용적률, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수, 혈소판 수 및 혈액응고시간/잠재력 측정 단 시험물질 또는 대사산물에 산화 특성이 있는 경우에는 메트 헤모글로빈 농도 및 하인츠 소체(Heinz bodies)가 반드시 포함되어야 한다.

3.4.2 생화학 검사

- (1) 모든 동물에서 채취한 혈액 표본에 대해 생화학적 검사를 시행한다. (주 2)
- (2) 일정시간마다 채취한 소변 및 시험기간 마지막 주중에 채취한 소변에 대해 다음과 같은 항목을 측정한다.
: 외관, 용적, 삼투압 또는 비중, pH, 단백질, 글루코오스 및 혈액/혈구
- (3) 시험물질이 대사 측면에 영향을 미칠 수 있으면 다음과 같은 항목을 포함 한다.
: 칼슘, 인산염, 트리글리세리드(Triglyceride), 특정 호르몬, 콜린에스테라아제 (Cholinesterase)
- (4) 시험물질의 뇌하수체-갑상선 축에 미치는 영향이 나타나면 T3, T4 및 TSH(선택 사항)을 측정한다. (주 3)

3.4.3 병리학 검사

- (1) 시험에 사용된 모든 동물은 전체 부검을 통하여 체표, 개구부, 두개, 흉강, 복강 과 그 내용의 관찰을 포함한 육안적 검사를 실시한다. 모든 동물은 상세한 전체 부검을 실시하며 모든 병리 변화를 기록한다. (주 4) 조직병리학적 검사를 위해서 기관·조직을 적당한 보존액 중에 보존한다. (주 5)
- (2) 다음의 조직은 내분비 관련 효과에 대해 평가할 수 있는 징후를 제공할 수 있다. : 생식샘 (난소와 고환), 보조 성 기관(자궁 경관을 포함한 자궁, 부고환, 응고선을 포함한 정낭, 등 옆 부분 및 복부의 전립선), 질, 뇌하수체, 수컷 유선, 갑상선 및 부신
- (3) 선택사항으로 부검 시, 질도말표본 (Vaginal smears)을 제작하여 모든 암컷의 성 주기를 결정할 수 있다.
- (4) 모든 전체 병소를 검사해야 하며, 대조군 및 고용량 시험군에 속한 모든 동물의 보존된 기관 및 조직에 관해 완전한 조직병리학 검사를 수행한다. 고용량 시험군에서 변화가 관찰되면 이 검사는 모든 기타 용량군의 동물까지 연장한다. 보조군을 이용하는 경우, 시험군 내에서 영향이 나타나는 것으로 확인된 조직 및 기관에 대해서는 조직병리학을 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 결과 값은 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 독성 징후를 나타낸 동물의 수와 시작 시간, 지속기간, 독성 영향의 심각도를 포함한 독성 징후에 대한 설명, 병소를 나타내는 동물의 수와 병소의 유형, 각 병소 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 등록번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법

- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험 시작 및 종료 시 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아니라면 사용한 종에 대한 근거 및 적정성

2.6 시험 조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 제형/사료 준비내역, 달성된 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내역에 대한 세부사항
- (4) 실제투여량 (mg/kg(체중)/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

2.7. 조사한 선택적 종단점 (주 6)

2.8 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수 섭취량
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 감각적 활동, 그립강도악력 및 운동 활동 평가 (가능한 경우)
- (7) 관련 기준 값을 이용한 혈액학적 시험 결과
- (8) 관련 기준 값을 이용한 임상 생화학 시험 결과
- (9) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료
- (10) 부검 조사결과
- (11) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명
- (12) 흡수량 자료(가능한 경우)
- (13) 결과의 적절한 통계적 처리

2.9 결론

주 1) 관찰사항

- (1) 일반 상태의 관찰사항 : 피부, 털, 눈, 점막 변화, 분비물과 배설물의 발생 및 자율신경 활동(예, 눈물 분비, 털 세움, 동공 크기, 다른 호흡 패턴), 간대성 또는 간질성 경련, 상동증(예, 과도한 털 손질, 반복적인 빙글빙글 돌기) 또는 기괴한 행동(예, 자해, 뒤로 걷기), 걸음걸이 변화, 자세 및 손을 댔을 때 반응의 변화
- (2) 네 번째 투여 주간 행동기능 관찰사항 : 상이한 유형의 자극에 대한 감각 반응도(예, 청각, 시각 및 자기수용성(Proprioceptive) 자극), 악력 강도, 운동 활동

주 2) 혈액 표본에 대한 생화학 측정 항목

- (1) 나트륨, 칼륨, 글루코오스, 총 콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총 단백질 및 알부민
- (2) 간세포 영향을 나타내는 아래 효소 중 2 개 이상과 담즙산
(예 : Alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, γ -glutamyl trans-peptidase, glutamate dehydrogenase)
- (3) 특정 상황 하에서 추가 효소(간 또는 다른 데서 유래한) 및 빌리루빈
- (4) 시험물질이 대사에 영향을 미치는 경우 : 칼슘, 인산염, 트리글리세리드, 특정 호르몬, 콜린에스터라아제 (Cholinesterase)

주 3) 갑상선 활성 화학물질 평가를 위한 T3 및 T4 정량시 고려사항

- (1) 표본은 -20 °C 에서 냉동상태로 보관한다.
- (2) 다음과 같은 요인을 고려한다.
 - ① 하루 동안의 호르몬 농도 변화 때문에, 안락사 되는 시각
 - ② 호르몬 농도에 영향을 미칠 수 있는 동물에 대한 부당한 스트레스를 피하기 위한 안락사 방법
 - ③ 표준 곡선 별로 상이할 수 있는 호르몬 측정용 시험 키트
- (3) 혈장 표본은 비슷한 시각에 획득되어야 한다.
- (4) 실험실내 균일한 데이터 확보를 위해 T3 및 T4에 대해서는 대조군 변동 계수를 25 미만으로, 또한 TSH에 대해서는 35 미만으로 유지한다.
- (5) 모든 농도는 ng/mL 단위로 기록한다.

주 4) 병리학적 검사를 위한 부검 항목

- (1) 모든 동물의 간, 신장, 부신, 고환, 부고환, 응고선을 포함한 전립선 + 정낭, 흉선, 비장, 뇌, 심장, 자궁 경관을 포함한 한 쌍의 난소는 부착 조직을 제거 후 건조를 피하기 위해 가능한 빨리 습중량을 측정한다.
- (2) 건조를 피하기 위해 해부 후 가능한 한 빨리 다른 조직 2 개의 무게를 선택적으로 달 수 있다 (예 : 자궁 경관을 포함한 한 쌍의 난소(습중량)와 자궁
- (3) 갑상선은 조직이 손상되면 병리조직학적 분석이 손상될 수 있으므로, 중량(선택 사항)은 고정 후에 측정될 수 있다.

주 5) 조직의 유형 및 후속 병리조직학적 검사를 위해 보존 항목

모든 전체 병소, 뇌(대뇌, 소뇌 및 뇌교를 포함한 부위), 척수, 눈, 위, 소장과 대장 (페이에르판(Peyer's patches) 포함), 간, 신장, 부신, 비장, 심장, 흉선, 갑상선, 기도, 폐 (고정액으로 팽창 시킨 후 보존), 생식샘 (고환과 난소), 보조 성기관 (자궁과 자궁 경관, 부고환, 응고선을 포함한 전립선 + 정낭), 질, 방광, 림프절 (근위의 배액림프절 와 다른 림프절), 말초 신경(좌골 또는 경골), 골격근및골수 (부분, 또는 대안으로서, 새로 고정시킨 골수 흡인물)가 포함된 뼈, 고환(매염제에 고정)

주 6) 내분비계장애물질 (EDs, Endocrine disrupters)을 검출하기 위해 권장되는 종말점

의무적 종말점	선택적 종말점
중량	
<ul style="list-style-type: none"> - 고환 - 부고환 - 부신 - 응고선을 포함한 전립선 + 정낭 	<ul style="list-style-type: none"> - 난소 - 자궁 경관을 포함한 자궁 - 갑상선
조직병리학	
<ul style="list-style-type: none"> - 생식샘: <ul style="list-style-type: none"> -고환 및 -난소 - 보조 성 기관: <ul style="list-style-type: none"> -부고환, -응고선을 포함한 전립선 + 정낭 -자궁 경관을 포함한 자궁 - 부신 - 갑상선 - 질 	<ul style="list-style-type: none"> - 질구 - 수컷 유선 - 뇌하수체
호르몬 측정	
	<ul style="list-style-type: none"> - T3, T4의 순환 수준 - TSH의 순환 수준

제7항 90일 반복경구투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류에 시험물질을 90 일 동안 반복 경구투여하여 생체에 미치는 기능 및 형태 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성, 표적 기관 및 축적 가능성을 평가하고 아울러 만성독성시험 및 인체 노출에 대한 안전기준 설정에 필요한 투여용량 수준을 선택하고, 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)의 추정치를 제공하는 데 그 목적이 있다. 특히 신경독성, 내분비, 면역 및 생식 기관에 영향을 미치는 화학물질을 선별하는 데 필요한 근거를 제공한다.

2. 용어 정의

2.1. 용량(Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게(체중) 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.2. 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)

노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리 집단 간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

2.3. 위관투여법(Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.4. 회복군(Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여종료 후 시험물질로 인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는지 확인하기 위해 필요시 추가하는 동물군

2.5. 빈사상태(Moribund status)

시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 90 일 동안 여러 군의 동물에게 군 당 1 개 용량으로 매일 경구 투여하고, 투여 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물 및 생존 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1. 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 9 주령 미만의 건강한 수컷 및 분만의 경험이 없거나 수태경험이 없는 암컷을 사용 한다. 마우스와 같은 다른 설치류도 사용할 수 있다. 본 시험이 향후 더 오랜 기간 동안 투여되는 장기간의 독성시험에 대한 예비시험으로 시행될 경우에는 두 시험 모두 동일한 계통 및 공급처의 동물을 이용한다.
- (2) 시험동물을 대조군과 시험군에 무작위로 할당하며 케이지 배치로 인한 영향이 최소화 되도록 한다. 시험 시 동물의 체중 변동은 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다. 시험동물들은 최소 5 일 동안 실험실 조건에 적응하도록 한다. 동물에게 고유 식별 번호를 부여한다.
- (3) 각 투여 용량에서 최소 20 마리의 동물(암컷 10 마리, 수컷 10 마리)을 사용하며 중간에 안락사하여 검사를 하는 경우 거기에 필요한 수를 미리 추가한다. 회복군으로 화학물질의 노출 종료 후 독성 영향의 가역성이나 지속성을 관찰하기 위해 대조군 및 고용량 투여 그룹에 추가적으로 10 마리씩(암수 각 5 마리) 추가할 수 있다. 회복기간은 관찰되는 영향을 고려하여 적절하게 설정한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 또는 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2. 사육조건

2.2.1. 모든 동물을 사용하는 과정은 동물 복지 기준을 따라야 한다. 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넠리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염 여부에 대해 정기적으로 분석한다.

2.2.2. 호르몬 활성을 갖는 물질이 사료에 함유되지 않도록 하며 식물성 에스트로겐 함량은 사료 g 당 Genistein 당량으로서 $350\ \mu\text{g}$ 을 초과하지 않아야 한다.

2.3. 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용액/현탁액 사용이 우선적으로 권장되고, 오일이 함유된 용액/현탁액, 기타 용매 순으로 사용한다. 물 이외의 용매를 사용할 경우에는 용매의 독성여부와 용매 내 시험물질의 안정성 및 균질성이 확인되어야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험물질의 투여

- (1) 시험동물에게 90 일 동안 매주 7 일간 매일 투여한다. 주 5 일 투여와 같은 다른 투여 요법을 실시할 때는 그에 대한 논리적 이유가 입증 되어야 한다. 시험물질은 위관투여법이나 사료나 음용수를 통해 투여되며 경구 투여방법은 시험물질의 특성 및 연구 목적에 따라 다르다.
- (2) 위관투여법으로 투여 시 단일 용량 단위로 투여한다. 경구투여 하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g (체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g (체중)까지 허용한다. 매일 비슷한 시간에 투여하며, 동물의 체중을 고려한 일정 투여량 수준을 유지하기 위해 필요에 따라 조정할 수 있다.

- (3) 최소 3 단계 투여량의 시험군과 대조군을 이용한다. (한계시험이 시행되는 경우 제외) 대조군은 미시험군이거나 용매-대조군이어야 하며, 시험물질을 처치하는 것 외에는 대조군에 속하는 동물을 시험군에 속하는 동물과 동일하게 취급하며, 용매를 사용할 경우 대조군은 시험군에 사용된 용매의 최고 용적 단위로 투여한다.
- (4) 투여용량은 반복 투여량 또는 용량설정시험의 결과를 기준으로 할 수 있으며 기존의 독성학적 및 독성 동태학적 자료를 고려한다. 최고 용량은 독성유도를 목표로 선택한다. 최소 용량에서 용량 반응성 및 무영향관찰용량을 확인하기 위해 투여량 수준은 2 배 ~ 4 배 간격의 내림차순으로 선택한다.
- (5) 시험물질을 사료와 섞어 투여할 경우에는 시험물질이 섞인 사료의 섭취량이 줄어들면 사료의 섭취량을 고려한 짝-공급형(Pair-fed) 대조군을 둔다. 사료나 음용수로 투여된 시험물질은 정상적인 영양 및 물의 체내 균형을 방해하지 않아야 하며 일정한 사료농도(ppm)나 동물의 체중을 고려한 일정 투여량이 사용될 수 있다.

3.2. 한계시험

이 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg와 동등한 1 개 용량에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험은 필요하지 않으며, 사람에게 노출 시 더 높은 투여량이 사용될 필요가 있을 때 외에는 한계시험을 적용할 수 있다.

3.3. 관찰사항

- (1) 관찰기간은 최소 90 일로 한다. 일반적인 임상관찰은 최소 1 일 1 회, 매일 같은 시간에, 투여 후 예상 영향이 최대로 나타나는 기간을 고려하여 시행하여야 한다. 동물의 임상상태는 최소 1 일 2 회, 통상 매일관찰하며 시작할 때와 끝날 때 이환율과 사망률의 징후에 대해 모든 동물을 관찰하고 기록한다. 모든 동물에 대한 상세한 임상관찰은 최초 노출 전 최소 1 회, 그 후 주 1 회 실시하여 기록한다. 관찰사항은 (주 1)에 표시하였다.

- (2) 명확히 규정된 채점 시스템을 이용하여 관찰하며, 관찰 조건의 변동은 최소가 되도록 한다.
- (3) 시험물질 투여 전과 시험종료 시, 검안경이나 적합한 장비를 이용해 고용량 투여군 및 대조군에 대해 반드시 안과학적 검사를 실시하며, 눈에서 변화가 검출되면 모든 동물에 대해 검사를 실시한다. 11 주차 이후에는 감각 반응도 (청각, 시각 및 자기수용성 자극), 그립강도, 그리고 운동 활동에 대한 평가를 실시한다.
- (4) 모든 시험동물의 체중은 최소 주 1 회 측정한다. 사료 및 음용수 섭취량은 최소 주 1 회 측정한다.

3.4. 검사항목

3.4.1. 혈액학 검사

시험 종료 시 동물을 안락사 시키기 직전에 혈액을 채취한다. 혈액 표본 추출 전 시험동물은 하룻밤 절식시키며(단, 마우스는 제외) 시험 기간 중 혈액표본 채취 시 다음의 항목을 검사한다. ; 적혈구용적률, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 망상적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수, 혈소판 수 및 혈액응고시간/잠재력 측정

3.4.2. 생화학 검사

- (1) 시험 종료 시 획득한 혈액 표본에 대한 생화학적 검사를 수행한다. (주 2)
- (2) 일정시간마다 채취한 소변 및 시험 마지막 주중에 채취한 소변에 대해 다음과 같은 항목을 측정한다. ; 외관, 용적, 삼투압 또는 비중, pH, 단백질, 글루코오스 및 혈액/혈구
- (3) 시험물질이 대사 측면에 영향을 미칠 수 있으면 다음과 같은 항목을 포함한다. ; 칼슘, 인산염, 트리글리세리드(Triglyceride), 특정 호르몬, 메트헤모글로빈 및 콜린에스터라아제(Cholinesterase)
- (4) 주요 시험군 및 회복군의 혈액 표본으로부터 혈청 총 T4, T3 및 TSH (Thyroid Stimulating Hormone)를 측정하며, 경우에 따라서는 성 호르몬(예, 테스토스테론, 에스트라디올, 난포자극호르몬, 황체형성호르몬 등) 측정도 고려하여야 한다. 측정 농도는 ng/mL 단위로 기록한다.

3.4.3. 병리 조직 검사

- (1) 시험 종료 시, 모든 수컷에 대해 고환 및 부고환 무게를 기록한다. 최소한 수컷 당 한 개의 부고환은 조직병리학적 검사에 사용하며, 필요 시 나머지는 부고환 꼬리부에 존재하는 정자의 양, 형태 또는 운동성 평가에 사용한다.
- (2) 정자 형태를 부가적으로 평가하고자 하는 경우, 부고환(또는 정관) 정자 표본을 고정 또는 습식 방법으로 검사하며, 표본 당 적어도 200 개 정자에 대해 검사하고 정상(머리와 중간/꼬리 모두 정상으로 나타남) 또는 비정상으로 분류한다.
- (3) 정자와 관련한 시험 분석은 대조군과 투여군에 대해 수행한다. 정자운동성 검사는 모든 수컷에 대해 실시한다(선택사항).
- (4) 부검 시 모든 암컷에 대해 성주기 평가를 위한 질 도말 검사를 수행하여야 한다.

3.4.4. 부검

- (1) 시험에 사용된 모든 동물은 상세한 전체 부검을 실시하며 모든 병리학적 변화를 기록한다. 모든 동물의 간, 신장, 부신, 고환, 부고환, 전립선+정낭(응고선 포함), 자궁, 난소, 흉선, 비장, 뇌, 심장은 부착 조직을 제거 후 가능한 빨리 습중량을 측정한다.
- (2) 조직병리학적 검사를 위해서 기관·조직을 적당한 보존액 중에 보존한다. (주 3)

3.4.5. 조직병리

- (1) 대조군 및 고용량 투여군으로부터 추출된 모든 장기 및 조직에 대해 조직병리학적 검사를 실시한다. 전체 병소를 육안으로 검사한다. 고용량에서 시험물질에 의한 조직병리학적 변화가 관찰되는 경우 저용량 투여군으로 확대하여 검사를 실시한다.
- (2) 시험물질 처리군에서 조직병리학적 변화가 관찰되는 장기 및 조직이 있을 경우 회복군의 장기 및 조직에 대해서도 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 자료는 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 독성 징후를 나타낸 동물의 수와 시작 시간, 지속기간, 독성 영향의 심각도를 포함한 독성 징후에 대한 설명, 병소를 나타내는 동물의 수와 병소의 유형, 각 병소 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다.
- (3) 대조군 자료를 동일한 실험실, 종 및 계통에서 유래한 과거의 대조군 값과 비교함으로써 시험자료의 질적관리를 실시한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 단일조성물질의 물리적 외관, 수용해도 및 물리화학적 성질
- (6) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질의 화학적 동정, 함유량 및 구성성분의 물리화학적 성질

2.4. 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5. 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 군별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험 시작 및 종료 시 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아니라면 사용한 종에 대한 근거 및 적정성 정당화

2.6. 시험조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 제형/사료 준비내역, 달성된 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내역에 대한 세부사항
- (4) 실제투여량(mg/kg(체중)/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

2.7. 결과

- (1) 체중 및 체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수 섭취량
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 용량별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부 무관하게)
- (6) 안과학적 검사의 결과
- (7) 감각적 활동, 그립 강도 및 운동 활동 평가(가능한 경우)

- (8) 관련 기준 값을 이용한 혈액학적 시험 결과
- (9) 관련 기준 값을 이용한 임상 생화학 시험 결과
- (10) 혈중 갑상선 호르몬 농도(T4, T3 TSH; 필수)
- (11) 에스트로겐, 테스토스테론 등 혈중 성 호르몬 측정(측정한 경우)
- (12) 호르몬 농도 측정 방법(정량 유형, 공급 업체, 프로토콜 등)
- (13) 시험 말기 체중, 기관의 중량 및 기관/체중의 비율
- (14) 질 말단에서의 세포검사
- (15) 모든 병리 조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명
- (16) 총 부고환 꼬리부위의 정자 수, 운동성 정자의 비율, 형태학적으로 정상 및 비
정상 정자의 비율(선택사항)
- (17) 흡수량 자료 (가능한 경우)
- (18) 결과의 적절한 통계적 처리
- (19) 시험 종료 전 동물이 죽은 경우 그 사유
- (20) 시험 중 동물이 사망한 경우, 사망의 원인(가능한 경우)

2.8. 결론

주 1) 관찰사항

- (1) 관찰시 목격된 징후
- (2) 피부, 털, 눈, 점막 변화, 분비물과 배설물 발생
- (3) 자율신경반응 (예, 눈물분비, 털 세움, 동공 크기, 이상한 호흡패턴)
- (4) 간헐적 경련성 및 강직성 안구 운동, 정형적인 거동 및 특이한 행동, 걸음걸이, 자세, 취급에 대한 반응

주 2) 혈액 표본에 대한 임상 생화학 측정 항목

- (1) 나트륨, 칼륨, 글루코오스, 총 콜레스테롤, HDL (High Density Lipoprotein), LDL (Low Density Lipoprotein), 요소, 혈중요소질소, 크레아티닌, 총 단백질 및 알부민
- (2) 간세포 영향을 나타내는 아래 효소 중 2 개 이상
(예) Alanine aminotransferase, Aspartate aminotransferase, Alkaline phosphatase, γ -Glutamyl trans-peptidase, Sorbitol dehydrogenase
- (3) 특정 상황 하에서 추가 효소(간 또는 다른 데서 유래한), 담즙산 및 빌리루빈
- (4) 일반조직손상

주 3) 조직의 유형 및 후속 조직병리학적 검사를 위해 보존할 필요가 있는 조직 목록

심한 손상을 보이는 모든 병소, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교를 포함한 대표부위), 척수(경부, 중흉부, 요추), 뇌하수체, 갑상선, 부갑상선, 흉선, 식도, 침샘, 위, 큰 창자, 작은 창자(페이에르판(Peyer's patches) 포함), 간, 췌장, 신장, 부신, 비장, 심장, 기도, 폐(고정액으로 팽창 시킨 후 보존), 대동맥, 난소, 자궁, 자궁경부, 질, 고환, 부고환, 정낭, 응고선, 유선(수컷 및 암컷), 전립선, 방광, 담낭(마우스), 림프절(투여 경로 부근 및 투여 경로에서 멀리 위치한 것), 근육과 근접한 말초 신경(좌골 또는 경골), 골격근, 뼈 및 골수, 피부와 눈(안과학 검사 중에 변화가 관찰 되었을 시), 시험물질의 표적 기관의 가능성이 큰 기관

부록 1

내분비 활성 검출에 권장되는 종말점

필수 측정	선택 측정
장기 무게	
고환 부고환 부신 전립선+전체 복합체로서 응고선과 정낭 자궁 난소 뇌하수체 갑상선	
조직병리학	
갑상선 및 부갑상선 부신 뇌하수체 고환 부고환 복측 및 배측면 전립선 정낭 및 응고선 난소 자궁경부 질 자궁 부검 시 수집된 질 도말 유선 (암컷 및 수컷)	췌장섬
혈청/혈장 생화학	
총 콜레스테롤 HDL LDL	
혈청/혈장 호르몬 분석	
티록신 (T4) TSH T3	FSH LH Estradiol Testosterone
정자 측정	
부고환 꼬리 부위의 정자수 정자 운동성 정자 형태	

제8항 21 일/28 일 반복 경피투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 21 일 또는 28 일간 경피 반복투여를 통해 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

피부에 바른 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 : mg/kg)로 표시

2.2 무영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질 투여로 인한 독성 반응이 관찰되지 않는 최고 투여 용량

2.3 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 여러 군의 동물에게 21 일/28 일 동안 군당 1 개 용량으로 매일 시험물질을 피부에 바르고, 바르는 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 사망한 동물과 끝까지 살아남은 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 성숙한 랫드, 토끼 또는 기니피그를 사용하고 다른 동물을 이용하는 경우에는 그 근거와 적정성이 제시되어야 한다. 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 시험을 시작할 때는 다음의 중량 범위를 권장 한다: 랫드 (200 g ~ 300 g). 토끼 (2.0 kg ~ 3.0 kg), 기니피그 (350 g ~ 450 g)
- (2) 각 투여량 별 상처가 없는 건강한 피부를 가진 최소 10 마리의 (암컷 5 마리, 수컷 5 마리)의 동물을 사용한다. 중간에 안락사 시켜 검사를 하는 경우 안락사에 필요한 수를 미리 추가한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 순화시킨 후, 무작위로 시험군과 대조군으로 나눈다.
- (3) 시험시작 약 24 시간 전, 면도기 등으로 피부에 상처를 내지 않도록 시험동물의 피모를 제거한다. 체표면적의 최소 10 % 이상을 제모하며, 제모 범위 및 시험물질 적용 범위 결정 시 동물의 체중을 고려한다. 시험 시 반복적인 제모나 수염 깎기는 통상 주간 간격으로 실시한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

동물은 개별적으로 케이지에 사육하며, 시험동물실의 온도는 설치류 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 토끼 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 을 유지하고, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.

2.3 시험물질

분말상태의 고체를 시험 할 경우, 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위해 물이나 적당한 용매를 이용해 충분히 습윤 시킬 수 있다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향을 고려하며, 액상 시험물질은 희석하지 않고 사용한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 대조군 또는 용매 대조군을 설정하고, 최소 3 개의 용량의 시험군을 설정한다.
(주 1) 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (2) 21 일 또는 28 일간의 반복투여독성시험의 투여기간을 제외하고 시험물질 투여 방법상의 차이는 없다. 투여기간 동안 매일 1 일 최소 6 시간 동안 각 시험군당 각각의 투여용량을 피부에 바른다. 주 7일 투여하는 것이 원칙이나 5 일간 적용하는 것이 허용될 수 있다.
- (3) 독성영향 및 지속성, 그로부터의 회복여부를 검사하기 위해 회복군 내 동물은 처치하지 않고 추가 14 일간 유지시킨다. 시험 중에 사망한 동물을 부검하며, 시험이 종결되면 살아남은 동물을 안락사 시키고 부검한다.
- (4) 시험물질은 전체표면적의 약 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 적용한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나, 도포부위 전체를 가능하면 얇고 균일한 필름상태로 넓게 피복해야 한다. 시험물질은 24 시간의 노출기간 중 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시키며 동물이 시험물질을 섭취하지 못하게 하여야 한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg이상의 용량시험에서 시험물질로 인한 독성 영향이 없고 시험물질과 유사한 화학물질의 독성데이터를 참고할 때 본 시험물질의 독성이 예측되지 않으면, 3 개 용량을 사용한 본시험은 필요하지 않다.

3.3 관찰사항

- (1) 시험기간 동안 매일 1 회 이상 상세한 임상관찰을 한다. 독성영향의 시작 시간, 정도 및 지속시간을 포함한 징후는 관찰 되는대로 정확히 기록한다. 동물의 증상은 피부, 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 동종포식, 조직의 자기분해, 잘못된 배치 등에 의해 동물이 손실되지 않도록 정기적으로 관찰한다.
- (2) 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다.
- (3) 시험이 끝난 후, 시험군 중 살아남은 모든 동물은 안락사 시키고, 빈사상태의 동물이 관찰되면 안락사 시킨다.

3.4 검사항목

- (1) 모든 동물에 대해 생화학적 검사를 한다. (주 2) 소변검사는 일상적 기준으로는 필요하지 않으며, 신장 독성 등 주요 독성이 예측되거나 확인될 경우에는 소변검사를 실시한다.
- (2) 모든 동물은 전체 부검을 실시하며 전체 육안적 병리 변화를 기록한다. 간, 신장, 부신, 고환은 해부 후 신속히 습중량을 측정한다. 다음 기관과 조직은 향후 가능한 병리조직학적 검사를 위해 적정한 고정액에 보존한다.; 정상피부 및 처치된 피부, 간, 신장, 표적기관
- (3) 고용량 시험군과 대조군의 고정된 기관 및 조직에서 조직학적 검사를 실시한다. 필요 시 기타 시험군도 조직학적 검사를 실시할 수 있다. 회복군은 다른 시험군에서 영향이 나타난 기관과 조직에 대해 조직학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 각 시험군 별로 시험시작 시 동물 수, 병소를 나타내는 동물의 수, 병소의 유형과 각 병소의 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다. 관찰된 모든 결과는 적절한 통계적 방법으로 평가한다.
- (2) 결과는 시험물질의 투여량, 이상의 유무, 발생률과 심각도간의 관계 및 거동 및 임상이상, 전체 병소, 표적기관, 체중변화, 사망률에 미치는 영향 및 독성영향을 포함하도록 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호

- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량

2.6 결과

- (1) 독성 및 기타영향
- (2) 성별 및 투여량 별 독성반응 결과
- (3) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (4) 각 이상 징후 및 후속과정 관찰시간
- (5) 사료섭취량 및 체중 값
- (6) 혈액학 시험 결과
- (7) 생화학 시험 결과
- (8) 부검 조사결과
- (9) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명 및 통계적 처리

2.7 결론

주 1) 투여량 수준 설정 기준

- (1) 1 개 이상 중간 투여량 이용 시, 독성효과가 단계적으로 나타나도록 투여량 수준에는 적절한 간격을 둔다.
- (2) 최고 용량수준에서 독성 영향이 발생해야 하지만, 평가에 영향을 미칠만한 사망이 발생해서는 안 된다.
- (3) 고용량 단계에서 심각한 피부자극성이 발생하면 농도를 줄일 수 있다. 시험 초기에 피부가 심하게 손상되면 연구를 종료하고 저용량에서 새로운 연구를 수행할 필요가 있다.
- (4) 중간 용량은 최소한의 독성영향이 생기는 수준을 설정한다.
- (5) 최저 용량수준에서 독성이 발생하지 않고, 인체 노출에 대한 추정치를 이용할 수 있는 경우, 최저 용량수준은 이를 초과해야 한다.
- (6) 저용량과 중간용량 및 대조군에서는 유의한 결과를 도출하기 위해 사망 발생률이 낮아야한다.

주 2) 독성평가 항목

- (1) 혈액학적 평가 항목 : 적혈구용적률(Hematocrit), 헤모글로빈농도, 적혈구 수, 전체 및 분화 백혈구 수 및 응고시간, 프로트롬빈 시간, 트롬보플라스틴 시간
- (2) 임상 생화학 측정 항목 : 칼슘, 인, 염화물, 나트륨, 칼륨, 음식용 글루코오스(종에 적절한 음식 기간과 함께), 효소활성(Glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxalacetic transaminase, ornithine decarboxylase, γ -glutamyl trans-peptidase), 요소 질소, 알부민, 혈액 크레아티닌, 총 빌리루빈 및 총 혈청 단백질량
- (3) 기타 독성학적 평가 항목 : 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트헤모글로빈(Methemoglobin) 및 콜린에스터라아제 (Cholinesterase) 활성 평가

제9항 90 일 반복 경피투여독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 90 일간 경피 반복 노출을 통해 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 용량 (Dose)

피부에 바른 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게 (체중) 당 시험물질의 무게 (예 : mg/kg)로 표시

2.2 무영향관찰용량 (NOAEL, No observed adverse effect level)

시험물질 투여로 인한 독성 반응이 관찰되지 않는 최고 투여 용량

2.3 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복 되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4 빈사상태 (Moribund status)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

몇 가지 용량의 시험물질을 여러 군의 동물에게 90 일 동안 군당 1 개 용량으로 매일 시험물질을 피부에 바르고, 바르는 기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 죽은 동물과 끝까지 살아남은 동물을 부검하여 병리조직학적, 임상적 검사를 실시하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 성숙한 랫드, 토끼 또는 기니피그를 사용하고 다른 동물을 이용하는 경우에는 정당성이 상세하게 입증해야 한다. 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용 한다. 시험을 시작할 때는 다음의 중량 범위를 권장 한다: 랫드 (200 g ~ 300 g), 토끼 (2.0 kg ~ 3.0 kg), 기니피그 (350 g ~ 450 g)
- (2) 각 투여량 별 상처가 없는 건강한 피부를 가진 최소 20 마리의 (암컷 10 마리, 수컷 10 마리)의 동물을 사용한다. 중간에 안락사하여 검사를 하는 경우 시험을 진행할 때, 필요시 질병상태를 모니터링 하기 위해 추가하는 동물군에 필요한 수를 미리 추가한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다.
- (3) 시험시작 약 24 시간 전, 면도기 등으로 피부에 상처를 내지 않도록 시험동물의 피모를 제거한다. 체표면적의 최소 10 % 이상을 제모하며, 제모 범위 및 시험물질 적용 범위 결정 시 동물의 체중을 고려한다. 시험 시 반복적인 제모나 수염 깎기는 통상 주간 간격으로 실시한다.
- (4) 동물의 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

동물은 개별적으로 케이지에 사육하며, 시험동물실의 온도는 설치류 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 토끼 $20^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 을 유지하고, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.

2.3 시험물질

분말상태의 고체를 시험 할 경우, 시험물질을 피부와 잘 접촉시키기 위해 물이나 적당한 용매를 이용해 충분히 습윤 시킬 수 있다. 용매를 사용할 경우 시험물질의 피부 투과성에 대한 용매의 영향을 고려하며, 액상 시험물질은 희석하지 않고 사용한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 대조군 또는 용매 대조군을 설정하고, 최소 3 개의 용량의 시험군을 시험한다.
(주 1) 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (2) 투여 동안 매일 1 일 최소 6 시간 동안 각 시험군당 각각의 용량을 피부에 바른다. 주 7일 투여하는 것이 원칙이나 5 일간 적용하는 것이 허용될 수 있다.
- (3) 독성영향 및 지속성, 그로부터의 회복여부를 검사하기 위해 회복군 내 동물은 처치하지 않고 추가 28 일간 유지시킨다. 시험 중에 사망한 동물을 부검하며, 시험이 종결되면 살아남은 동물을 안락사 시키고 부검한다.
- (4) 시험물질은 전체표면적의 약 10 % 범위에 해당하는 투여면적에 균일하게 적용한다. 독성이 강한 물질은 도포면적을 보다 적게 하는 경우도 있으나 도포부위 전체를 가능하면 얇고 균일한 필름상태로 넓게 피복해야 한다. 시험물질은 24 시간의 노출기간 중 다공성의 거즈, 비자극성 테이프를 사용하여 피부와 접촉을 유지시키며 동물이 시험물질을 섭취하지 못하게 하여야 한다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg이상의 용량시험에서 시험물질로 인한 관찰되는 독성영향이 없고 시험물질과 유사한 화학물질의 독성데이터를 참고할 때 본 시험물질의 독성이 예측되지 않으면, 3 개 용량을 사용한 본시험은 필요하지 않다.

3.3 관찰사항

- (1) 시험기간 동안 매일 1 회 이상 상세한 임상관찰을 한다. 독성영향의 시작 시간, 정도 및 지속시간을 포함한 징후는 관찰 되는대로 정확히 기록한다. 동물의 증상은 피부, 체모, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율신경 및 중추신경계, 전신운동능력 및 행동패턴을 포함하여 관찰한다. 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다. 동종포식, 조직의 자기분해, 잘못된 배치 등에 의해 동물이 손실되지 않도록 정기적으로 관찰한다.
- (2) 매 주 사료 소비량을 측정하고, 동물의 무게를 측정한다.
- (3) 시험이 끝난 후, 시험군 중 살아남은 모든 동물은 안락사 시키고, 빈사상태의 동물이 관찰되면 안락사 시킨다.

3.4 검사항목

- (1) 모든 동물에 대해 생화학적 검사를 한다. (주 2) 소변검사는 일상적 기준으로는 필요하지 않으며, 신장 독성 등 주요 독성이 예측되거나 확인될 경우에는 소변 검사를 실시한다.
- (2) 모든 동물은 전체 부검을 실시하며 전체 육안적 병리 변화를 기록한다. 간, 신장, 부신, 고환은 해부 후 신속히 습중량을 측정한다. 분리된 기관과 조직은 향후 가능한 병리조직학적 검사를 위해 적정한 고정액 내에 보존한다. (주 3)
- (3) 대조군 및 고용량 시험군에 속하는 모든 동물의 정상 및 처치된 피부, 그리고 기관과 조직에 관해서는 완전한 조직병리학 검사를 수행한다. 모든 전체 병소를 검사한다. 다른 투여용량 군내에 있는 표적 기관을 검사해야 한다. 회복군은 다른 시험군에서 영향이 나타난 기관과 조직에 대해 조직학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 각 시험군 별로 시험시작 시 동물 수, 병소를 나타내는 동물의 수, 병소의 유형과 각 병소의 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다. 관찰 된 모든 결과는 적절한 통계적 방법으로 평가한다.
- (2) 결과는 시험물질의 투여량, 이상의 유무, 발생률과 심각도간의 관계 및 거동 및 임상이상, 전체 병소, 표적기관, 체중변화, 사망률에 미치는 영향 및 독성영향을 포함하도록 한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질

- (1) 식별정보 및 CAS 번호

- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량

2.6 결과

- (1) 독성 및 기타영향
- (2) 성별 및 투여량 별 독성반응 데이터
- (3) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (4) 각 이상 징후 및 후속과정 관찰시간
- (5) 사료 및 체중 데이터
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 부검 조사결과
- (9) 모든 병리조직학적 조사결과에 대한 상세한 설명 및 통계적 처리

2.7 결론

주 1) 투여 용량 설정 기준

- (1) 1 개 이상 중간 투여량 이용 시, 독성효과가 단계적으로 나타나도록 투여량 수준에는 적절한 간격을 둔다.
- (2) 최고 용량수준을 이용하면 독성 영향이 발생해야 하지만, 평가에 영향을 미칠만한 사망이 발생해서는 안 된다.
- (3) 고용량 단계에서 심각한 피부자극성이 발생하면 농도를 줄일 수 있다. 단, 시험 초기에 피부가 심하게 손상되면 연구를 종료하고 저용량에서 새로운 연구를 수행 할 필요가 있다.
- (4) 중간 용량은 최소한의 독성영향이 생기는 수준을 설정한다.
- (5) 최저 용량수준에서 독성이 발생하지 않고, 인체 노출에 대한 추정치를 이용할 수 있는 경우, 최저 용량수준은 이를 초과해야 한다.
- (6) 저용량과 중간용량 및 대조군에서는 유의한 결과를 도출하기 위해 사망 발생률이 낮아야한다.

주 2) 독성평가 항목

- (1) 안과학적 검사 : 시험물질에 노출되기 전과 시험이 종료될 때 검안경이나 동등한 적합한 장비를 이용한 안과학적 검사를 해야 하며, 모든 동물에서 시행하면 더 좋지만 최소한 고 투여량 그룹 및 대조군에서는 검사해야 한다. 눈에서 변화가 검출되면 모든 동물을 검사해야 한다.
- (2) 혈액학적 평가 항목 : 적혈구용적률(Hematocrit), 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 전체 및 차이 백혈구 수, 그리고 응고 시간, 프로트롬빈 시간, 또는 트롬보플라스틴 시간과 같은 응고 잠재력, 또는 혈소판 수의 측정을 포함한 혈액학을 시험 기간이 끝났을 때 조사해야 한다.
- (3) 임상 생화학 측정 항목 : 칼슘, 인, 염화물, 나트륨, 칼륨, 공복시 글루코오스(종에 적절한 금식 기간과 함께), 효소활성(Glutamic-pyruvic transaminase, glutamic oxaloacetic transaminase, ornithine decarboxylase, gamma glutamyl transpeptidase), 요소 질소(urea nitrogen), 알부민, 혈액 크레아티닌, 총 빌리루빈 및 총 혈청 단백질 량

주 3) 병리조직학적 검사를 위해 보전해야 하는 조직

- (1) 모든 전체 병소, 수질/뇌교 부분을 포함한 뇌, 소뇌 피질 및 대뇌 피질, 뇌하수체, 갑상선/부갑상선, 흉선, 폐, 심장, 대동맥, 침샘, 간, 비장, 신장, 부신, 췌장, 생식샘, 보조 성 기관, 담낭(존재하면), 식도, 위, 십이지장, 공장, 회장, 맹장, 결장, 직장, 방광, 대표 림프절, 말초신경
- (2) 독성의 징후가 있거나 표적 기관과 관련된다고 표시되는 경우 : 기도, 암컷 유선, 넓적다리 근육계, 눈, 골수를 포함한 흉골, 관절면을 포함한 대퇴골, 세 가지 레벨에서 척수 (경부, 중간 흉부 및 요추), 눈외 눈물샘.

제10항 28 일 반복 흡입독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 28 일 동안 시험물질을 반복흡입 노출시켜 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하고, 추가적으로 90 일 반복 흡입독성 연구를 위한 노출농도 선정에 관한 정보를 얻는데 목적이 있다. 또한, 나노물질 뿐만 아니라 흡입되는 가스, 증기 및 에어로졸의 물리적 특성에 따른 최신 과학기술을 반영한다.

2. 용어 정의

2.1 농도 및 용량(Concentration/Dose)

실험동물에 노출되는 공기 중 시험물질의 농도를 나타내며 단위는 노출되는 공기의 단위부피당 시험물질의 양 (mg/L, 에어로졸 및 증기의 경우) 또는 시험물질의 부피 (ppm, 가스의 경우)로 표시

2.2 기관지폐포세척(BAL, Bronchoalveolar lavage)

기관지에 튜브를 통해 식염수를 주입하고 폐포 내에 차 있는 세포 및 물질을 획득하기 위한 세척 (또는 세척액). BAL액 내 총 세포수와 호중구, 호산구, 대식세포 등의 세포수를 측정하여 반복 흡입 노출에 따른 독성을 평가하는데 이용

2.3 무영향관찰농도(NOAE, No observed adverse effect concentration)

시험물질노출과 관련된 유해소견이 관찰되지 않는 최고 농도. 노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리 집단 간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

2.4. 최소영향관찰농도(LOAE, Low observed adverse effect concentration)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 독성을 나타내는 최소 농도

2.5 최대내성농도(MTC, Maximum tolerated concentration)

시험동물을 죽이지 않는다고 알려진 물질의 최대 농도 (DL₀: Dominant Lethal 0 %) (IUPAC, 1993)

2.6 기준 농도(BMC, Benchmark concentration)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 독성영향이 대조집단에 비해 5 % 또는 10 %와 같은 특정 증가분이 발생했을 때 이에 해당되는 농도를 추정한 값

2.7 회복군 (Satellite group, Recovery group)

시험물질의 노출 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 자연, 유지 또는 회복되는지 확인하기 위해 필요시 추가하는 동물군

2.8 빈사상태 (Moribund status)

치료받더라도, 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

대조군 및 최소 3 개 농도의 시험군에 시험물질을 28 일간 반복 흡입 노출 시켜, 노출 기간 동안 동물의 독성 징후 관찰하고 시험 종결 후 남은 동물에 대해 부검 및 병리학적 분석을 통하여 시험물질의 호흡 노출에 따른 독성 가능성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 7 주령 ~ 9 주령 미만의 건강한 수컷과 임신 및 출산의 경험이 없는 암컷을 사용한다. 만약 다른 설치류 종을 이용하는 경우에는 그 근거와 적정성을 제시하여야 한다.
- (2) 체중은 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 이내여야 한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다. 시험동물은 개별 표시하며, 각 노출 용량 별 최소 10 마리 (암컷 5 마리, 수컷 5 마리)를 사용한다.
- (3) 동물 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키며 재시험을 피하기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

- (1) 시험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.
- (2) 비부로 노출되는 시험동물은 순화기간 동안 노출튜브에 대한 적응훈련이 필요하다. 전신 노출되는 동물들은 노출 시간동안 개별적으로 사육하여, 노출 시 실험 물질의 피모(Fur)를 통한 다른 동물로의 오염을 방지한다.

2.3 흡입 챔버

흡입 챔버를 선택할 때 시험 물질의 특성 및 시험의 목적을 고려해야하며 액체 또는 고체 에어로졸 및 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 증기에 대해서 일반적으로 비부 노출 챔버를 우선한다. 전신 노출 챔버 사용 시 그 적정성이 제시되어야 하며, 사용 동물의 총 용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 한다.

2.4 시험물질

가스, 증기, 에어로졸, 또는 그 혼합물 형태로 시험물질을 노출시킨다. 습기를 흡수하며 화학적 반응을 보이는 시험물질은 건조 공기 조건 하에서 시험한다. 시험에 부합한 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 모든 에어로졸과 증기에 대해서는 입자 크기를 줄여야 하며 물리적 공정(밀링)을 사용할 수 있다. 특히 나노물질과 같은 시험물질을 노출할 때 폐 영역의 노출을 향상시키기 위해 기하학적 표준편차(σ_g)가 1 ~ 3 내에 있고 공기역학중량평균지름(MMAD)의 범위가 $\leq 2 \mu\text{m}$ 인 에어로졸을 권장한다. 단 이러한 기준치를 벗어날 가능성이 있는 시험물질에 대해서는 이에 대한 적절한 판단 및 근거를 제시한다.

3. 시험 방법

3.1 시험물질의 노출

- (1) 노출시 한계농도는 (주 1)에 따라 설정한다.

3.2 노출농도 설정 시험

- (1) 28 일간 반복 흡입독성시험의 본시험을 수행하기 전 노출 농도 설정 시험을 수행할 것을 권장한다. 분석 방법, 입경 분포, 전신독성, 독성동력학, 폐에서의 시험물

질 용해성, 입자의 이동, 독성 기전, 임상 병리 (혈액학/혈액생화학), 조직 병리, 폐손상 생체지표, 성 감수성, 기관지폐포세척액(BALF) 분석 및 본 시험에서의 무해농도(NO₂AEC, LO₂AEC, MTC, BMC) 예측에 대한 기술적인 정보들을 제공한다.

- (2) 동물에게 과도한 스트레스를 주지 않는 허용 한계 농도를 결정하고 시험물질의 독성을 가장 잘 확인할 수 있는 측정항목을 확인하기 위해 농도 설정 시험을 수행할 수 있다. 이때 기관지폐포세척액 분석은 시험물질 노출 종료 또는 회복기간에 주기적으로 수행할 수 있으며, 고체 에어로졸 시험 시 시험물질 용해성과 폐 침착 평가는 노출 후 회복 기간과 관찰 간격을 설정하기 위해 수행될 수 있다. 폐관련림프절(LALN) 침착 시험은 시험물질 이동에 대한 정보를 제공하기 위해 수행될 수 있다.
- (3) 하나 또는 그 이상의 농도군으로 구성하여 수행하며, 시험의 목적에 따라서 5 마리 이하의 수컷과 암컷 동물들을 각각 사용한다. 노출 기간은 5 일 이상으로 하며 일반적으로 14 일을 초과하지 않도록 설계하나 난용성 입자의 경우에는 14 일을 초과할 수 있으며 회복군을 둘 수 있다. 본 시험 농도 결정에 대한 이론적 근거를 시험 보고서에 제공해야 한다.

3.3 본시험

- (1) 음성(공기)대조군 또는 용매 대조군과 적어도 시험물질 3개 농도를 설정한다. 대조군은 시험군과 동일한 방법으로 취급한다. 물을 용매로 사용할 경우에는 상대 습도가 동일한 공기에 노출한다. 성 감수성의 차이가 있을 경우 성별에 따라 다른 농도를 설정할 수도 있다.
- (2) 시험물질의 성질에 따라 두 가지의 시험설계로 나누어진다. 일반적인 시험설계 사례는 (주 2)에 제시하였으며 시험물질(가스, 증기, 에어로졸 또는 이들의 혼합물)의 폐내 침착 가능성에 따라 A와 B로 설계된다.
- (3) 각 군은 최소한 5 마리 수컷과 5 마리 암컷 설치류로 구성되고, 시험물질은 4 주 동안(28 일), 주당 5 일, 하루 6 시간 동안 시험동물에 노출시키며, 주당 7 일 동안의 노출도 가능하다. 랫드 이외의 설치류 중에 비부 노출하는 경우 종 특이적 고통을 최소화하기 위해 최대 노출 시간을 조정할 수 있으며 그 근거를 제시해야 한다. 노출 시간 (최대 6 시간을 초과하지 않을 때) 중에는 사료를 제공하지 않고, 전신 노출 시 음용수는 공급할 수 있다.

- (4) 고농도는 독성이 나타나지만 평가에 장애가 되거나 사망이 유도되지 않는 농도로 설정한다. 중농도는 저농도와 고농도의 독성 영향이 단계적으로 차이가 나타나도록 간격을 두어야 한다. 저농도는 이상적으로 NOAEC에 해당되며 독성이 나타나지 않아야 한다.

3.4 중간 부검

본시험 노출기간 동안 중간 부검이 계획된다면, 동물 수는 증가되어야 한다. 중간 부검을 사용하기 위한 근거가 제공되어야 하며 통계 분석이 고려되어야 한다.

3.5 위성시험(회복군)

- (1) 시험물질의 노출 종료 후 시험물질에 기인한 독성 증상의 지연, 유지, 회복 또는 폐침착을 확인하기 위해 본시험 외에 추가적으로 회복군을 두는 위성시험을 할 수 있다.
- (2) 위성시험(회복군)의 사례는 (주2)에 제시하고 있으며 시험설계 A 및 B에서 본시험과 동일한 농도로 수컷 5마리와 암컷 5마리의 시험동물에 동시 노출된다.
- (3) 위성시험에는 폐침착 가능성이 있는 난용성 고체에어로졸시험을 위한 폐침착 시험과 기관지폐포세척액 분석을 할 수 있는 회복군 1 또는 2를 둘 수 있다.

3.6 노출

다음의 사항에 관하여 측정 또는 모니터링을 행한다.

3.6.1 챔버 기류

챔버의 공기 흐름은 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 기록한다. 비부노출시키는 챔버 안에서는 동물의 재호흡을 방지한다. 산소농도는 최소 19 % 이상 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

3.6.2 온도와 습도

챔버 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다. 동물의 호흡 구역 내 습도는 30% ~ 70%가 유지하며, 노출 시간동안 연속적으로 관찰하고 매 시간 기록한다.

3.6.3 명목 농도 (Nominal concentration)

명목 농도는 흡입 챔버 시스템을 통과한 총 공기량에 대한 생성된 시험물질의 질량의 비로 나타낸다

3.6.4 분석 농도 (Analytical concentration)

- (1) 동물의 호흡구역 내에서 표본을 추출하여 시험물질의 분석 농도를 측정한다. 매우 복잡한 혼합물은 각 위상(가스/증기 및 에어로졸)의 최소한 1 개 지표물질(분해물질 또는 활성물질)을 선택하여 측정한다. 제형형태의 혼합물 시험물질은 전체 제형에 대한 분석 농도를 측정한다.
- (2) 노출 대기를 일정하게 유지하며, 각 노출일 중 농도별 최소한 3회 측정한다. 시험물질이 챔버 평형에 달성할 때까지의 시간(t_{95})을 계산하여 기록하며, 실제 농도는 가스 및 증기의 경우 평균 챔버 농도에서 $\pm 10\%$, 액체 및 고체 에어로졸의 경우 $\pm 20\%$ 를 유지되어야 한다.

3.6.5 입자크기 분포 (Particle size distribution)

- (1) 입자크기 분포는 노출 시간 동안 농도별 최소한 주 1 회 이상 다단입경측정장치 (Cascade impactor) 또는 이에 상응하는 대체 장비(열역학적 등가 직경 또는 광학 입자 측정기 등) 등을 이용하여 측정한다. 측정 장비들은 측정 결과의 통일성 및 수거 효율이 입증되어야 한다.

응축되어 에어로졸을 형성할 수 있는 증기에 대해서는 입자크기를 측정한다.

- (2) 나노물질에 의해 생성된 에어로졸은 응집되어 나노 및 마이크로 크기의 입자를 형성할 수 있다. 따라서 정량적 입자노출(즉, 입자계수, 크기분포 또는 입자질량)을 측정하는 적어도 2가지 다른 방법이 사용되어야 한다.

또한 주사전자현미경(SEM) 또는 투과전자현미경(TEM) 검사를 통해 나노물질 등의 입자 크기 및 모양을 주기적으로 확인해야 한다.

3.7 관찰사항

- (1) 노출 기간 이전, 노출 중 및 노출 이후에 각 동물별 관찰 사항을 기록한다.(주 3) 안락사 시킨 경우나 사망하였을 경우에는 사망 시간을 기록한다.
- (2) 동물의 체중은 첫 번째 노출 전에 측정하여 기록하고 그 이후에는 주당 2 회 실시 한다. 첫 2 주 노출 동안에 특별한 체중 변화가 관찰되지 않을 경우, 남은 시험 기간 동안 주 1 회만 측정 할 수 있다. 회복 기간 내 회복군의 체중은 주간으로 측정한다. 시험 종료시 안락사 시키기 직전에 모든 동물의 체중을 측정하여 기록한다.
- (3) 사료섭취량은 주 1 회 이상 주기적으로 측정해야 하며, 음용수 섭취량은 시험 목적에 따라 측정할 수 있다.

3.8. 검사항목

- (1) 임상병리학적 평가는 대조군과 회복군을 포함한 모든 동물에 대해서 수행하며 안락사시킨 동물도 포함한다.(주 4) 폐침착 측정에 사용되는 회복군 동물에 대해서는 임상병리학적 평가가 요구되지 않지만, 필요에 따라 추가할 수 있다. 시험물질의 독성학적 영향에 대하여 보다 주의 깊은 평가가 필요한 경우 시험책임자는 측정항목을 추가할 수 있다.(주 5)
- (2) 기관지폐포세척 분석은 시험설계 A와 B(주 2)의 본시험(부검 후 24 시간 내)에서 암컷 및 수컷 각각 5 마리로 수행되어야 한다. 특히 난용성 에어로졸을 위한 시험설계 B의 경우 본시험 외에 위성시험인 회복군 1을 둘 수 있으며 암컷(5 마리씩)에서만 수행된다. 기관지폐포세척 분석은 오른쪽 폐에서 수행되며 필수 측정항목은 다음과 같다.
 - lactate dehydrogenase (LDH)
 - 총단백질 또는 알부민
 - 총세포수
 - 폐대식세포 수, 림프구수, 호중구 수 및 호산구 수
- (3) 폐침착시험(Lung burden)은 난용성고체아어로졸을 위한 시험설계 B(주 2)에서만 수행되며 부검 후 24시간 내에 수행되는 본시험과 여분의 노출 후 시점에서 설계될 수 있는 위성시험(회복군 1, 2)을 둘 수 있다. 폐침착시험은 수컷(5마리씩) 오른쪽 폐에서 수행된다(주 2).
- (4) 검안경이나 동등한 장치를 이용하여 시험물질을 노출하기 전 모든 동물 및 종료될 때 대조군 및 모든 고농도군에서 안저, 굴절매체, 홍채 및 결막에 대한 눈 검사를 수행한다. 눈에서 변화가 검출되면 회복군 동물을 포함한 다른 그룹에 속한 모든 동물을 검사한다.
- (5) 시험에 사용된 모든 시험동물(사망동물과 관찰기간이 끝난 생존동물)은 안락사시켜 부검을 실시하고 육안 병리검사를 수행한다. 사망동물 발견 직후 부검을 실시하지 못하는 경우 사망한 동물은 충분히 낮은 온도의 냉장상태(냉동 아님)로 보관하며 가능한 하루나 이틀 이내에 부검한다. 각 동물의 최종 노출 종료 시간과 안락사 사이의 시간을 기록한다.
- (6) 모든 육안 병리검사 결과는 개별적으로 각각의 동물에 대해서 기록하여야 하고 특히 호흡기 계통의 변화에 대해서는 주의 깊게 수행하여야 한다. 조직병리검사

를 위하여 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 하는 장기 및 조직은 (주 6)에 제시하고 있다. 왼쪽 폐는 조직병리를 위해 보존하여야 한다.

- (7) 대조군 및 고농도 시험군과 시험 수행 중 사망한 동물들에 조직병리검사를 수행한다.(주 6) 고농도 시험군의 장기 및 조직에서 조직병리검사 결과 시험물질에 기인한 증상이 관찰된 경우 모든 시험군에 대한 검사를 실시한다. 시험에서 회복군을 둔 경우, 시험군에서 영향이 확인된 모든 장기와 조직에서 조직병리 검사를 수행한다.
- (8) 농도설정시험에서 설치류의 반사적 호흡완서, 고통반사 또는 저체온증이 나타나면 본시험에서 폐기능과 체온을 정기적으로 측정하여 정량화해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 체중, 사료섭취량, 임상 병리학, 기관지폐포세척액 분석, 육안병리검사, 장기무게, 폐침착(평가시) 및 조직병리학에 관한 개별 동물 측정치가 제시되어야 한다.
- (2) 각 시험군 별로 동물의 수, 특정 독성 징후를 나타내는 동물의 수, 시험 중에 사망하였거나 인도적 이유로 사망처리한 동물의 수, 개별 동물의 사망 시각, 독성 영향 및 가역성에 대한 설명 및 시간 과정, 그리고 부검 조사결과를 표 형태로 요약 한다. 시험 결과는 연구 설계 중 선택된 통계적 방법으로 평가한다.
- (3) 입자 크기 기준(특히 MMAD)을 충족시킬 수 없다면 조사결과를 감안한 입자의 호흡가능성을 다뤄야 하며, 분석농도와 명목농도와의 관계가 시험의 전반적 평가에 포함 한다.
- (4) 사망의 원인과 독성작용기전을 추정하고, 심각하고 지속적인 통증을 나타내는 동물의 안락사에 대한 설명 및 표적장기를 확인한다.
- (5) 기준농도(BMC) 또는 무영향관찰농도(NO_{AEC}) 및 최소영향관찰농도(LO_{AEC})를 결정한다.
- (6) 본시험에서 발생한 모든 합병증에 관해 설명한다.
- (7) 회복군에서의 폐침착 측정 방법 및 설계에 대해 세부적으로 설명한다.

2. 시험결과와 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

(1) 식별정보 및 CAS 번호

(2) 물리적 성질과 순도

(3) 연구 시행과 관련되는 물리 화학적 특성 : 이성질화 및 방사성 표지 여부, 용해도 특성, 용해점, 비등점, pH(적절한 경우), 기압자료(가능한 경우), 나노물질과 같은 입자상 물질의 경우 입자모양, 표면적/비표면적, 표면화학, 코팅 및 표면변형, 표면전하, 입자용해도 및 응집/응결(aggregation/ agglomeration) 상태를 포함한다.

2.4 용매/보조제 종류

(1) 물 이외의 용매 사용의 적정성 자료

2.5 시험동물

(1) 동물의 종/계통

(2) 동물의 수, 주령, 성별

(3) 구입처, 사육환경, 사료

(4) 동물 군 분리시의 무작위 추출 방법

(5) 케이지 당 동물수 (변경사항)

(6) 사료, 검역, 질환에 대한 처치를 포함한 사전 시험 조건

2.6 시험조건

(1) 시험 물질 조제 내역

(2) 시험 대기 생성, 노출에 사용한 장비에 대한 설명

(3) 챔버 온도, 습도, 기류를 모니터 하기 위해 사용한 장비 내역

(4) 챔버 농도 및 입자 크기 분포 결정용 표본 수집 장비의 내역

- (5) 사용한 화학적 분석 방법의 내역 및 방법 검증
- (6) 무작위 추출 방법
- (7) 사료 및 음용수의 내역
- (8) 기관지폐포세척액 분석 및 폐침착 측정에 사용된 방법

2.7 흡입 챔버

- (1) 용적 및 다이어그램을 포함하여 흡입 챔버에 대한 상세한 설명
- (2) 대기 생성은 물론 동물 노출용으로 사용된 장비의 구입처와 설명
- (3) 온도, 습도, 입자 크기 및 분석 농도를 측정하기 위한 장비
- (4) 조절용으로 사용된 공기와 시스템의 출처
- (5) 균일한 시험대기를 보장하기 위해 장비의 교정에 사용된 방법
- (6) 차압(양압 및 음압)
- (7) 챔버당 노출 포트(비부 노출) : 챔버 내 동물의 위치(전신)
- (8) 시험 대기의 안정성
- (9) 온도 및 습도 센서의 위치와 챔버 내 시험 대기의 표본 추출
- (10) 공급된/추출된 공기의 처리
- (11) 송풍량, 송풍량/노출 포트(비부 노출), 또는 동물 하중/챔버(전신)
- (12) 흡입 챔버 평형까지의 시간(t_{95})
- (13) 시간당 용적 변경의 수
- (14) 해당하는 경우 계측장치

2.8 노출 자료

- (1) 공기 농도는 질량 단위(mg/L , mg/m^3 등)로 보고
- (2) 본시험에서 표적 농도 선택에 대한 이론적 근거
- (3) 명목농도
- (4) 동물의 호흡 구역으로부터 채취한 시험물질의 분석농도
- (5) 계산방법을 포함한 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD), 기하학적 표준 편차(σ_g), 개별 입자크기 분석, 열역학적등가직경(개수 또는 질량중앙값)
- (6) 에어로졸에서 나노물질의 응집도 분석

2.9 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수 섭취량 (필요시)
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 농도별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 기관지폐포세척액(BALF) 분석 결과
- (9) 폐침착 분석 결과 (측정시)
- (10) 폐기능 결과 및 체온 측정 결과 (측정시)
- (11) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료
- (12) 부검 조사결과
- (13) 모든 병리조직학적 조사결과 및 설명
- (14) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (15) 챔버의 명목농도 및 분석농도 자료
- (16) 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD) 및 기하학적 표준편차(σ_g)의 계산, 계수중앙직경(CMD) 및 기하학적 표준편차(σ_g) 등을 포함한 입자 크기 자료.
- (17) 결과의 적절한 통계적 처리

2.10 결론

주 1) 한계농도 설정

(1) 시험한 최고 농도에 대해서는 다음 사항을 고려하여 설정한다.

- ① 최대한 달성 가능한 농도
- ② 적절한 산소 공급을 유지해야 할 필요성
- ③ 동물 복지 고려사항

(2) 데이터에 기반한 한계농도가 별도로 없으면, 유엔 화학물질의 분류 및 표지에 관한 세계 조화 시스템의 급성 한계농도가 사용될 수 있다.

- ① 에어로졸에 대해서는 5 mg/L
- ② 증기에 대해서는 20 mg/L
- ③ 가스에 대해서는 20,000 ppm

(3) 가스나 휘발성이 매우 높은 시험 물질(예컨대, 냉매)을 시험할 때 이러한 한계를 초과할 필요가 있다면 그 정당성을 입증해야한다.

주 2) 시험 설계(예시)

(1) 시험설계 A

- ① 시험군은 음성(공기)대조군 또는 용매대조군과 적어도 시험물질 3 개 농도를 설정한다.
- ② 본시험의 경우 최종 노출 후 1 일 이내에 부검한다.
- ③ 위성시험(회복군 1)의 경우 시험책임자에 의해 부검 일자를 설계할 수 있다.
- ④ 조직병리는 왼쪽 폐에서 기관지폐포세척액 분석은 오른쪽 폐에서 수행한다.
- ⑤ 각 군당 마리수는 최소한 암컷 5 마리, 수컷 5 마리로 수행한다.

노출군	본시험		위성시험 (회복군 1)*		총동물수
대조군	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	20 마리
저농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	20 마리
중농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	20 마리
고농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	20 마리
동물수	20F / 20M	Σ = 40 마리	20F / 20M	Σ = 40 마리	Σ=80마리

(2) 시험설계 B (예시)

- ① 시험군은 음성(공기)대조군 또는 부형제(용매) 대조군과 적어도 시험물질 3 개 농도를 설정한다.
- ② 본시험의 경우 최종 노출 후 1 일 이내에 시험한다.
- ③ 위성시험(회복군 1 및 2)의 경우 시험책임자에 의해 부검 일자를 설계할 수 있다.
- ④ 조직병리는 좌폐에서 기관지폐세척액 및 폐침착 분석은 우폐에서 수행한다.
- ⑤ 각 군당 마리수는 최소한 암컷 5 마리, 수컷 5 마리로 수행한다.

<본시험>

노출군	본시험				총동물수
대조군	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
저농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
중농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
고농도	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
동물수	20F / 20M	Σ = 40 마리	20M	Σ = 20 마리	Σ=60마리

<위성시험>

노출군	위성시험 (회복군 1)				위성시험 (회복군 2)		총동물수
대조군	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타 (좌폐)	15 마리
저농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
중농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
고농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
동물수	20F	Σ = 20 마리	20M	Σ = 20 마리	20M	Σ = 20 마리	Σ=60마리

주 3) 임상관찰사항

- (1) 피부와 털, 눈, 그리고 점막 변화; 호흡기계 및 순환계 변화, 신경계 변화, 그리고 운동 활동 및 거동 패턴 변화
- (2) 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 그리고 혼수상태에 대한 관찰
- (3) 직장 온도의 측정을 통한 처치나 보정에 관련된 반사적 호흡완서, 통증반사 또는 저/고체온에 대한 보충 증거
- (4) 연구 프로토콜에 생물 감시, 폐 기능 평가 및 거동 변화와 같은 추가 평가가 포함될 수 있다.

주 4) 표준 임상 병리학 파라미터

- (1) 혈액학 검사 항목 : 적혈구 수, 전체 백혈구 수, 헤마토크릿, 분화(Differential) 백혈구 수, 헤모글로빈 농도, 혈소판 수, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 양, 평균 혈구 헤모글로빈 농도, 망상적혈구, 응고 가능성(택1, 프로트롬빈 시간, 응고 시간, 부분 트롬보플라스틴 시간)
- (2) 생화학 검사 항목 : 글루코오스 (야간 공복 후), 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 혈액 요소성 질소, 총 빌리루빈, 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 글로불린, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파르트산염 아미노기 전이효소, 알칼리 인산가수분해효소, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 인, 염화물
- (3) 뇨 검사 항목 (선택사항) : 외관(색상 및 혼탁도), 총 단백질, 용적, 글루코오스, 비중 또는 삼투압, 혈액/혈구, pH

주 5) 시험물질의 독성의 특성화를 위해 추가 평가 항목 :

Cholinesterase, 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트헤모글로빈(Methaemoglobin) 또는 하인츠(Heinz) 소체, Creatine kinase, 골수세포(bone marrow cytology), 트로포닌, lactate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, gamma glutamyl transpeptidase

주 6) 전체 부검 중에 보존할 기관 및 조직

- (1) 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 한다.
- (2) 갑상선의 중량을 정확히 측정하기 위해 결체조직 등을 제거하다보면 이러한 과정이 병리조직학적 평가를 방해할 수 있기 때문에 필요한 경우에만 중량을 달아야 한다.
- (3) 조직병리에 사용되는 왼쪽 폐는 온전하게 제거하여, 무게를 달고, 폐 조직이 유지되도록 확실히 하기 위해 20 cm ~ 30 cm의 물 압력에서 고정한다. 폐 침착 측정을 수행하는 회복군의 경우 왼쪽 및 오른쪽 폐 모두의 무게를 측정할 수 있다.
- (4) 비인두 조직의 경우 최소한 4 개 부위를 검사해야 하며, 편평 상피, 이행 상피(무섬모 호흡기), 호흡기(섬모 호흡기) 및 후각 상피, 그리고 배수 림프 조직(NALT)을 적절히 검사할 수 있도록 하기 위해 그 중 하나에 비인두관이 포함되어야 한다. 후두의 3 개 부위를 검사해야 하며, 이 레벨 중 하나에 후두개의 바닥이 포함되어야 한다. 폐 외부 기관지의 분기 용골을 통한 1 개 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 기도의 최소한 2 개 부위를 검사해야 한다.
- (5) 부검 조직 목록 : 골수(및/또는 새로운 흡인물), 후두(3 개 부위, 후두개의 바닥 포함), 폐문림프절(난용성입자상 물질 연구), 심층연구 및 면역학적 연구(후종격내막, 부교감, 후목, 귀관, 목/아래턱밑 림프절 고려), 림프절(distal from the portal-of-entry), 비인두 조직(최소한 4 개 부위; 1 개 부위는 비인두관 및 비강 연관 면역조직(NALT) 포함), 식도, 후각신경구, 정낭, 척수(경부, 중간 흉부 및 요추), 위, 기도(용골을 통한 1개 세로 부분과 1개 가로 부분을 포함한 최소한 2개 부위), 방광, 전체 병소 모두
- (6) 보존을 위해 잘 다듬어져야 하는 기관 및 조직 목록 : 부신, 비장, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 심장, 신장, 고환, 난소, 흉선, 간, 폐(늑막과 주기관지를 포함한 왼쪽 폐. 최소한 3 개 부위), 갑상선(고정 후에 트리밍 및 중량 측정), 자궁
- (7) 시험책임자의 판단에 따라 보존될 수 있는 기관 및 조직 : 눈(망막, 시신경) 및 눈꺼풀
- (8) 시험물질의 이동(translocation)을 평가할 필요가 있다면 관련 조직의 입자침착은 보존된 조직병리학 조직 표본에서 측정할 수 있다. 또한 LALN에서의 입자 침착은 난용성 미립자를 시험할 때 항상 이동의 지표로 측정된다.

제11항 90 일 반복 흡입독성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 90 일 동안 시험물질을 매일 반복흡입 노출시켜 발생할 가능성이 있는 시험물질의 독성을 평가하고, 추가적으로 만성 흡입독성시험을 위한 용량선정에 관한 정보를 얻는데 목적이 있다. 또한, 나노물질 뿐만 아니라 흡입되는 가스, 증기 및 에어로졸의 물리적 특성에 따른 최신 과학기술을 반영한다.

2. 용어 정의

2.1 농도 및 용량(Concentration/Dose)

실험동물에 노출되는 공기 중 시험물질의 농도를 나타내며 단위는 노출되는 공기의 단위부피당 시험물질의 양 (mg/L, 에어로졸 및 증기의 경우) 또는 시험물질의 부피 (ppm, 가스의 경우)로 표시됨.

2.2 기관지폐포세척(BAL, Bronchoalveolar lavage)

기관지에 튜브를 통해 식염수를 주입하고 폐포 내에 차 있는 세포 및 물질을 획득하기 위한 세척 (또는 세척액). BAL액 내 총 세포수와 호중구, 호산구, 대식세포 등의 세포수를 측정하여 반복 흡입 노출에 따른 독성을 평가하는데 이용

2.3 무영향관찰농도(NOAEC, No observed adverse effect concentration)

시험물질노출과 관련된 유해조건이 관찰되지 않는 최고 농도. 노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리집단 간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량을 말함.

2.4. 최소영향관찰농도(LOAEC, Low observed adverse effect concentration)

시험물질을 시험동물에 노출하였을 때 시험동물에 독성을 나타내는 최소 농도

2.5 최대내성농도(MTC, Maximum tolerated concentration)

시험동물을 죽이지 않는다고 알려진 물질의 최대 농도 (DL₀: Dominant Lethal 0 %) (IUPAC, 1993)

2.6 기준 농도(BMC, Benchmark concentration)

시험물질을 시험동물에 노출하였을 때 독성영향이 대조집단에 비해 5 % 또는 10 %와 같은 특정 증가분이 발생했을 때 이에 해당되는 농도를 추정한 값.

2.7 회복군(Satellite group, Recovery group)

시험물질의 노출 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상이 자연, 유지 또는 회복되는지 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.8 빈사상태(Moribund status)

치료받더라도, 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

대조군 및 3 개 용량의 시험군에 시험물질을 90 일간 (랫드 수명의 약 10 %) 반복 흡입 노출 시켜, 노출 기간 동안 동물의 독성 징후를 관찰하고 시험 종결 후 남은 동물에 대해 부검 및 병리학적 분석을 통하여 시험물질의 호흡 노출에 따른 독성 가능성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로 선호되는 설치류 종은 랫드이며, 생후 7 ~ 9 주령 미만의 건강한 수컷과 임신 및 출산의 경험이 없는 암컷을 사용한다. 만약 다른 설치류 종을 이용하는 경우에는 그 근거와 적정성을 제시하여야 한다.
- (2) 체중은 각 성별 평균 체중의 $\pm 20\%$ 이내여야 한다. 동물을 시험 전 최소한 5 일 동안 실험실 조건에 익숙해지게 한 후, 무작위로 시험군과 대조군에 할당한다. 시험동물은 개별 표시하며, 각 노출 농도 별 최소 20 마리 (암컷 10 마리, 수컷 10 마리)를 사용한다.
- (3) 동물 사용을 최소화하고 시험의 질적 수준을 향상시키며 재시험을 피하기 위해서 시험물질에 대한 이용 가능한 모든 정보를 활용한다. 빈사상태의 동물이나 질병 및 고통이 지속되는 동물은 인도적으로 안락사 시킨다.

2.2 사육조건

- (1) 시험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다.
- (2) 비부로 노출되는 시험동물은 순화기간 동안 노출튜브에 대한 적응훈련이 필요하다. 전신 노출되는 동물들은 노출 시간동안 개별적으로 사육하여, 노출 시 실험 물질의 피모(Fur)를 통한 다른 동물로의 오염을 방지한다.

2.3 흡입 챔버

흡입 챔버를 선택할 때 시험 물질의 특성 및 시험의 목적을 고려해야하며 액체 또는 고체 에어로졸 및 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 증기에 대해서 일반적으로 비부 노출 챔버를 우선한다. 전신 노출 챔버 사용 시 그 적정성이 제시되어야 하며, 사용 동물의 총 용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 한다.

2.4 시험물질

가스, 증기, 에어로졸, 또는 그 혼합물 형태로 시험물질을 노출 시킨다. 습기를 흡수하며 화학적 반응을 보이는 시험물질은 건조 공기 조건 하에서 시험한다. 시험에 부합한 에어로졸을 형성하도록 응결될 수 있는 모든 에어로졸과 증기에 대해서는 입자 크기를 줄여야 하며 물리적 공정(밀링)을 사용할 수 있다. 특히 나노물질과 같은 시험물질을 노출할 때 폐 영역의 노출을 향상시키기 위해 기하학적 표준편차(σ_g)가 1 ~ 3 이내에 있고 공기역학중량평균지름(MMAD)의 범위가 $\leq 2 \mu\text{m}$ 인 에어로졸을 권장한다. 단 이러한 기준치를 벗어날 가능성이 있는 시험물질에 대해서는 이에 대한 적절한 판단 및 근거를 제시한다.

3. 시험 방법

3.1 시험물질의 노출

- (1) 노출 시 한계농도는 (주 1)에 따라 설정한다.

3.2 노출농도 설정 시험

- (1) 90 일간 반복 흡입독성시험의 본시험을 수행하기 전 노출 농도 설정 시험을 수행할 것을 권장한다. 분석 방법, 입경 분포, 전신독성, 독성동력학, 폐에서의 시

험물질 용해성, 입자의 이동, 독성 기전, 임상 병리 (혈액학/임상화학), 조직 병리, 폐손상 생체지표, 성감수성, 기관지폐포세척액(BALF) 분석 및 본 시험에서의 무해농도 (NOAEC, LOAEC, MTC, BMC) 예측에 대한 기술적인 정보들을 제공한다.

- (2) 동물에게 과도한 스트레스를 주지 않는 허용 한계 농도를 결정하고 시험물질의 독성을 가장 잘 확인할 수 있는 측정항목을 확인하기 위해 농도 설정 시험을 수행할 수 있다. 이때 기관지폐포세척액 분석은 시험물질 노출 종료 또는 회복 기간에 주기적으로 수행할 수 있으며, 고체 에어로졸 시험 시 시험물질 용해성과 폐 침착평가는 노출 후 회복 기간과 관찰 간격을 설정하기 위해 수행될 수 있다. 폐관련림프절(LALN) 침착 시험은 시험물질 이동에 대한 정보를 제공하기 위해 수행될 수 있다.
- (3) 하나 또는 그 이상의 농도군으로 구성하여 수행하며, 시험의 목적에 따라서 5 마리 이하의 수컷과 암컷 동물들을 각각 사용한다. 노출 기간은 5 일 이상으로 하며 일반적으로 28 일을 초과하지 않도록 설계하나 난용성 입자의 경우에는 28 일을 초과할 수 있으며 회복군을 둘 수 있다.

본 시험 농도 결정에 대한 이론적 근거를 시험 보고서에 제공해야 한다.

3.3 본시험

- (1) 음성(공기)대조군 또는 용매 대조군과 적어도 시험물질 3개 농도를 설정한다. 대조군은 시험군과 동일한 방법으로 취급한다. 물을 용매로 사용할 경우에는 상대 습도가 동일한 공기에 노출한다. 성 감수성의 차이가 있을 경우 성별에 따라 다른 농도를 설정할 수도 있다.
- (2) 시험물질의 성질에 따라 두 개의 시험설계로 나누어진다. 일반적인 시험설계 사례는 (주 2)에 제시하였으며 시험물질(가스, 증기, 에어로졸 또는 이들의 혼합물)의 폐내 침착 가능성에 따라 A와 B로 설계된다.
- (3) 각 군은 최소한 10마리 수컷과 10마리 암컷 설치류로 구성되고, 폐침착 시험을 위해서는 여분의 수컷 5마리 시험을 수행한다. 시험물질은 13 주 동안(90 일), 주당 5 일, 매일 6 시간 동안 시험동물에 노출시키며, 주당 7 일 동안의 노출도 가능하다. 랫드 이외의 설치류 종에 비부 노출하는 경우 종 특이적 고통을 최소화하기 위해 최대 노출 시간을 조정할 수 있으며 그 근거를 제시해야 한다. 노출 시간 (최대 6시간을 초과하지 않을 때) 중에는 사료를 제공하지 않고, 전신 노출 시 음용수는 공급할 수 있다.

- (4) 고농도는 독성이 나타나지만 평가에 장애가 되거나 사망이 유도되지 않는 농도로 설정한다. 중농도는 저농도와 고농도의 독성 영향이 단계적으로 차이가 나타나도록 간격을 두어야 한다. 저농도는 이상적으로 NOAEC에 해당되며 독성이 나타나지 않아야 한다.

3.4 중간 부검

본시험 노출기간 동안 중간 부검이 계획된다면, 동물 수는 증가되어야 한다. 중간 부검을 사용하기 위한 근거가 제공되어야 하며 통계 분석이 고려되어야 한다.

3.5 위성시험(회복군)

- (1) 시험물질의 투여 종료 후 시험물질에 기인한 독성증상의 지연, 유지, 회복 또는 폐침착을 확인하기 위해 본시험 외에 추가적으로 회복군을 두는 위성시험을 할 수 있다.
- (2) 위성시험(회복군)의 사례는 (주2)에 제시하고 있으며 시험설계 A 및 B에서 본시험과 동일한 농도로 수컷 5마리와 암컷 5마리의 시험동물에 동시 노출된다.
- (3) 위성시험에는 폐침착 가능성이 있는 난용성 고체 에어로졸시험을 위한 폐침착 시험과 기관지폐포세척액 분석을 할 수 있는 회복군 1 또는 2를 둘 수 있다.

3.6 노출

다음의 사항에 관하여 측정 또는 모니터링을 행한다.

3.6.1 챔버 기류

챔버의 공기 흐름은 노출 시간 동안 최소한 한 시간 간격으로 기록한다. 비부 노출시키는 챔버 안에서는 동물의 재호흡을 방지한다. 산소농도는 최소 19 % 이상 유지시키고, 이산화탄소 농도는 1 %를 초과해서는 안 된다.

3.6.2 온도와 습도

챔버 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 를 유지한다. 동물의 호흡 구역 내 습도는 30 % ~ 70 %가 유지하며, 노출 시간동안 연속적으로 관찰하고 매 시간 기록한다.

3.6.3 명목 농도 (Nominal concentration)

명목 농도는 흡입 챔버 시스템을 통과한 총 공기량에 대한 생성된 시험물질의 질량의 비로 나타낸다.

3.6.4 분석 농도 (Analytical concentration)

- (1) 동물의 호흡구역 내에서 표본을 추출하여 시험물질의 분석 농도를 측정한다. 매우 복잡한 혼합물은 각 위상(가스/증기 및 에어로졸) 중 최소한 1 개 지표물질(분해물질 또는 활성물질)을 선택하여 측정한다. 제형형태의 혼합물 시험물질은 전체 제형에 대한 분석 농도를 측정한다.
- (2) 노출 대기를 일정하게 유지하며, 각 노출일 중 농도별 최소한 3 회 측정한다. 시험물질이 챔버 평형에 달성할 때까지의 시간(t_{95})을 계산하여 기록하며, 실제 농도는 가스 및 증기의 경우 평균 챔버 농도에서 $\pm 10\%$, 액체 및 고체 에어로졸의 경우 $\pm 20\%$ 를 유지되어야 한다.

3.6.5 입자크기 분포 (Particle size distribution)

- (1) 입자크기 분포는 노출 시간 동안 농도별 최소한 주 1 회 이상 다단입경측정장치(Cascade impactor) 또는 이에 상응하는 대체 장비(열역학적 등가 직경 또는 광학 입자 측정기 등)들을 이용하여 측정한다. 측정 장비들은 측정 결과의 통일성 및 수거 효율이 입증되어야 한다. 응축되어 에어로졸을 형성할 수 있는 증기에 대해서는 입자크기를 측정한다.
- (2) 나노물질에 의해 생성된 에어로졸은 응집되어 나노 및 마이크로 크기의 입자를 형성할 수 있다. 따라서 정량적 입자노출(즉, 입자계수, 크기분포 또는 입자질량)을 측정하는 적어도 2가지 다른 방법이 사용되어야 한다. 또한 주사전자현미경(SEM) 또는 투과전자현미경(TEM) 검사를 통해 나노물질 등의 입자 크기 및 모양을 주기적으로 확인해야 한다.

3.7 관찰사항

- (1) 노출 기간 이전, 노출 중 및 노출 이후에 각 동물별 관찰 사항을 기록한다.(주 3) 안락사 시킨 경우나 사망하였을 경우에는 사망 시간을 기록한다.
- (2) 동물의 체중은 첫 번째 노출 전에 측정하여 기록하고 그 이후에는 주당 2 회 측정을 실시한다. 첫 2 주 노출 동안에 특별한 체중 변화가 관찰되지 않을 경우, 남은 시험 기간 동안 주 1 회만 측정할 수 있다. 회복 기간 내 회복군의 체중은 주간으로 측정한다. 시험 종료 시 안락사 시키기 직전에 모든 동물의 체중을 측정하여 기록한다.
- (3) 사료섭취량은 주 1 회 이상 주기적으로 측정해야 하며, 음용수 섭취량은 시험 목적에 따라 측정할 수 있다.

3.8 검사항목

- (1) 임상병리학적 평가는 대조군과 회복군을 포함한 모든 동물에 대해서 수행하며 안락사 시킨 동물도 포함한다.(주 4) 폐침착 측정에 사용되는 회복군 동물에 대해서는 임상병리학적 평가가 요구되지 않지만, 필요에 따라 추가할 수 있다. 시험물질의 독성학적 영향에 대하여 보다 주의 깊은 평가가 필요한 경우 시험책임자는 측정항목을 추가 할 수 있다.(주 5)
- (2) 기관지폐포세척 분석은 시험설계 A와 B(주 2)의 본시험(부검 후 24시간 내)에서 암컷 및 수컷 각각 5마리로 수행되어야 한다. 특히 난용성 에어로졸을 위한 시험설계 B의 경우 본시험 외에 위성시험인 회복군 1을 둘 수 있으며 암컷(5마리씩)에서만 수행된다. 기관지폐포세척 분석은 오른쪽 폐에서 수행되며 필수 측정항목은 다음과 같다.
 - lactate dehydrogenase (LDH)
 - 총단백질 또는 알부민
 - 총세포수
 - 폐대식세포 수, 림프구수, 호중구 수 및 호산구 수
- (3) 폐침착시험(Lung burden)은 난용성고체아어로졸을 위한 시험설계 B(주 2)에서만 수행되며 부검 후 24시간 내에 수행되는 본시험과 여분의 노출 후 시점에서 설계될 수 있는 위성시험(회복군 1, 2)을 둘 수 있다. 폐침착시험은 수컷(5마리씩) 오른쪽 폐에서 수행된다(주 2).
- (4) 검안경이나 동등한 장치를 이용하여, 시험물질을 노출하기 전 모든 동물 및 종료될 때 대조군 및 모든 고농도군에서 안저, 굴절매체, 홍채 및 결막에 대한 안과학적 검사를 수행한다. 눈에서 변화가 검출되면 회복군 동물을 포함한 다른 그룹에 속한 모든 동물을 검사한다.
- (5) 시험에 사용된 모든 시험동물(사망동물과 관찰기간이 끝난 생존동물)에 대하여는 안락사 시켜 부검을 실시하고 육안 병리검사를 수행한다. 사망동물 발견 직후 부검을 실시하지 못하는 경우 사망한 동물은 충분히 낮은 온도의 냉장상태(냉동 아님)로 보관하며 가능한 하루나 이틀 이내에 부검한다. 각 동물의 최종 노출 종료 시간과 안락사 사이의 시간을 기록한다.
- (6) 모든 육안 병리검사 결과는 개별적으로 각각의 동물에 대해서 기록하여야 하고 특히 호흡기 계통의 변화에 대해서는 주의 깊게 수행하여야 한다.

조직병리검사를 위하여 장기 및 조직을 육안 병리검사 시 적절한 고정액에 고정해야 한다. (주 6) 다듬어진 기관들은 건조를 피하기 위해 해부 후 가능한 빨리 습중량을 측정한다. 왼쪽 폐는 조직병리를 위해 보존되어야 한다.

- (7) 대조군 및 고농도 시험군과 시험 수행 중 사망한 동물들에 조직병리검사를 수행한다. (주 6) 고농도 시험군의 장기 및 조직에서 조직병리검사 결과 시험물질에 기인한 증상이 관찰된 경우 모든 시험군에 대한 검사를 실시한다. 시험에서 회복군을 둔 경우, 시험군에서 영향이 확인된 모든 장기와 조직에서 조직병리 검사를 수행한다.
- (8) 농도설정시험에서 설치류의 반사적 호흡완서, 고통반사 또는 저체온증이 나타나면 본시험에서 폐기능과 체온을 정기적으로 측정하여 정량화해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 결과는 표로 요약한다. 체중, 사료섭취량, 임상 병리학, 기관지폐포세척액 분석, 육안병리검사, 장기무게, 폐침착(평가시), 및 조직병리학에 관한 개별 동물 측정치가 제시되어야 한다.
- (2) 각 시험군 별로 동물의 수, 특정 독성 징후를 나타내는 동물의 수, 시험 중에 사망하였거나 인도적 이유로 사망 처리한 동물의 수, 개별 동물의 사망 시각, 독성 영향 및 가역성에 대한 설명 및 시간 과정, 그리고 부검 조사결과를 표 형태로 요약 한다. 시험 결과는 연구 설계 중 선택된 통계적 방법으로 평가한다.
- (3) 입자 크기 기준(특히 MMAD)을 충족시킬 수 없다면, 조사결과를 감안한 입자의 호흡 가능성을 다뤄야 하며, 분석농도와 명목 농도와의 관계를 시험의 전반적 평가에 포함한다.
- (4) 사망의 원인과 독성작용기전을 추정하고, 심각하고 지속적인 통증을 나타내는 동물의 안락사에 대한 설명 및 표적장기를 확인한다.
- (5) 기준농도 (BMC) 또는 무영향관찰농도 (NOAEC) 및 최소영향관찰농도 (LOAEC)를 결정한다.
- (6) 본시험에서 발생한 모든 합병증에 관해 설명한다.
- (7) 회복군에서의 폐침착 측정 방법 및 설계에 대해 세부적으로 설명한다.

2. 시험결과와 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

(1) 식별정보 및 CAS 번호

(2) 물리적 성질과 순도

(3) 연구 시행과 관련되는 물리 화학적 특성:

이성질화 및 방사성 표지 여부, 용해도 특성, 용해점, 비등점, pH(적절한 경우), 기압자료(가능한 경우), 나노물질과 같은 입자상 물질의 경우 입자모양, 표면적/비표면적, 표면화학, 코팅 및 표면변형, 표면전하, 입자용해도 및 응집/응결 (aggregation/ agglomeration) 상태를 포함한다.

2.4 용매/보조제 종류

(1) 물 이외의 용매 사용의 적정성 자료

2.5 시험동물

(1) 동물의 종/계통

(2) 동물의 수, 주령, 성별

(3) 구입처, 사육환경, 사료

(4) 동물군 분리시의 무작위 추출 방법

(5) 케이지 당 동물수 (변경사항)

(6) 사료, 검역, 눈 검사 및 질환에 대한 처치를 포함한 사전 시험 조건

2.6 시험조건

(1) 시험 물질 조제 내역

(2) 시험 대기 생성, 노출에 사용한 장비에 대한 설명

- (3) 챔버 온도, 습도, 기류를 모니터 하기 위해 사용한 장비 내역
- (4) 챔버 농도 및 입자 크기 분포 결정용 표본 수집 장비 내역
- (5) 사용한 화학적 분석 방법의 내역 및 방법 검증
- (6) 무작위 추출 방법
- (7) 사료 및 음용수의 내역
- (8) 기관지폐포세척액 분석 및 폐침착 측정에 사용된 방법

2.7 흡입 챔버

- (1) 용적 및 다이어그램을 포함하여 흡입 챔버에 대한 상세한 설명
- (2) 대기 생성은 물론 동물 노출용으로 사용된 장비의 구입처와 설명
- (3) 온도, 습도, 입자 크기 및 분석농도를 측정하기 위한 장비
- (4) 조절용으로 사용된 공기와 시스템의 출처
- (5) 균일한 시험 대기를 보장하기 위해 장비의 교정에 사용된 방법
- (6) 차압(양압 및 음압)
- (7) 챔버당 노출 포트(비부 노출); 챔버 내 동물의 위치(전신)
- (8) 시험 대기의 안정성
- (9) 온도 및 습도 센서의 위치와 챔버 내 시험 대기의 표본 추출
- (10) 공급된/추출된 공기의 처리
- (11) 송풍량, 송풍량/노출 포트(비부 노출), 또는 동물 하중/챔버(전신)
- (12) 흡입 챔버 평형까지의 시간(t_{95})
- (13) 시간당 용적 변경의 수
- (14) 해당하는 경우 계측장치

2.8 노출 자료

- (1) 공기 농도는 질량 단위(mg/L , mg/m^3 등)로 보고
- (2) 본시험에서 표적 농도 선택에 대한 이론적 근거
- (3) 명목농도
- (4) 동물의 호흡 구역으로부터 채취한 시험물질의 분석농도
- (5) 계산방법을 포함한 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD), 기하학적 표준편차(σ_g), 개별 입자크기 분석, 열역학적등가직경(개수 또는 질량중앙값)
- (6) 에어로졸에서 나노물질의 응집도 분석

2.9 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료섭취량과 음용수 섭취량 (필요시)
- (3) 독성 징후를 포함한 성별 및 농도별 독성 반응 자료
- (4) 시험 중 사망한 시간 또는 시험 종료 시 동물의 생존여부
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부와 상관없이)
- (6) 혈액학적 시험 결과
- (7) 임상 생화학 시험 결과
- (8) 기관지폐포세척액(BALF) 분석 결과
- (9) 폐침착 분석 결과
- (10) 폐기능 결과 및 체온 측정 결과 (측정시)
- (11) 안락사 당시의 체중 및 기관 중량 측정 자료
- (12) 부검 조사결과
- (13) 모든 병리조직학적 조사결과 및 설명
- (14) 챔버 온도, 습도, 공기 유량
- (15) 챔버의 명목농도 및 분석농도 자료
- (16) 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD) 및 기하학적 표준편차(σ_g)의 계산, 계수중앙직경(CMD) 및 기하학적 표준편차(σ_g) 등을 포함한 입자 크기 자료
- (17) 결과의 적절한 통계적 처리

2.10 결론

주 1) 한계 농도 설정

(1) 시험한 최고 농도에 대해서는 다음 사항을 고려하여 설정한다.

- ① 최대한로 달성 가능한 농도
- ② 적절한 산소 공급을 유지해야 할 필요성
- ③ 동물 복지 고려사항

(2) 데이터에 기반한 한계농도가 별도로 없으면, 유엔 화학물질의 분류 및 표지에 관한 세계 조화 시스템의 급성 한계농도가 사용될 수 있다.

- ① 에어로졸에 대해서는 5 mg/L
- ② 증기에 대해서는 20 mg/L
- ③ 가스에 대해서는 20,000 ppm

(3) 가스나 휘발성이 매우 높은 시험 물질(예컨대, 냉매)을 시험할 때 이러한 한계를 초과할 필요가 있다면 그 정당성을 입증해야한다.

주 2) 시험 설계 (예시)

(1) 시험설계 A

- ① 시험군은 음성(공기)대조군 또는 용매대조군과 적어도 시험물질 3 개 농도를 설정한다.
- ② 본시험의 경우 최종 노출 후 1 일 이내에 부검한다.
- ③ 위성시험(회복군 1)의 경우 시험책임자에 의해 부검 일자를 설계할 수 있다.
- ④ 조직병리는 좌폐에서 기관지폐세척액 분석은 우폐에서 수행한다.
- ⑤ 본시험의 각 군당 마리수는 최소한 암컷 10 마리, 수컷 10 마리로 수행한다.
- ⑥ 위성시험(회복군)의 경우 각 군당 마리수는 암컷 5 마리, 수컷 5 마리로 수행한다.

노출군	본시험		위성시험 (회복군 1)*		총동물수
대조군	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	30 마리
저농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	30 마리
중농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	30 마리
고농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5F / 5M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	30 마리
동물수	40F / 40M	Σ = 80 마리	20F / 20M	Σ = 40 마리	Σ =120마리

(2) 시험설계 B (예시)

- ① 시험군은 음성(공기)대조군 또는 용매 대조군과 적어도 시험물질 3 개 농도를 설정한다.
- ② 본시험의 경우 최종 노출 후 1 일 이내에 시험한다.
- ③ 위성시험(회복군 1 및 2)의 경우 시험책임자에 의해 부검 일자를 설계할 수 있다.
- ④ 조직병리는 좌폐에서 기관지폐세척액 및 폐침착 분석은 우폐에서 수행한다.
- ⑤ 본시험의 기관지폐세척액을 위한 시험군의 경우 각 군당 마리수는 최소한 암컷 10마리, 수컷 10마리로 수행하며 폐내침착시험군의 경우 각 군당 수컷 5마리로 수행한다.
- ⑥ 위성시험(회복군)의 기관지폐세척액을 위한 시험군의 경우 각 군당 마리수는 암컷 5마리로, 폐내침착시험군의 경우 수컷 5마리로 수행한다.

<본시험>

노출군	본시험				총동물수
대조군	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타 (좌폐)	25 마리
저농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	25 마리
중농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	25 마리
고농도	10F / 10M	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	25 마리
동물수	40F / 40M	Σ = 80 마리	20M	Σ = 20 마리	Σ=100마리

<위성시험>

노출군	위성시험 (회복군 1)				위성시험 (회복군 2)		총동물수
대조군	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타 (좌폐)	15 마리
저농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
중농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
고농도	5F	BAL(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 조직병리(좌폐)	5M	폐내침착(우폐) 기타(좌폐)	15 마리
동물수	20F	Σ = 20 마리	20M	Σ = 20 마리	20M	Σ = 20 마리	Σ=60마리

주 3) 임상관찰사항

- (1) 피부와 털, 눈, 그리고 점막 변화; 호흡기계 및 순환계 변화, 신경계 변화, 그리고 운동 활동 및 거동 패턴 변화
- (2) 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 그리고 혼수상태에 대한 관찰
- (3) 직장 온도의 측정을 통한 처치나 보정에 관련된 반사적 호흡완서, 통증반사 또는 저/고체온에 대한 보충 증거
- (4) 연구 프로토콜에 생물 감시, 폐 기능 평가, 및 거동 변화와 같은 추가 평가가 포함될 수 있다.

주 4) 표준 임상 병리학 파라미터

- (1) 혈액학 검사 항목: 적혈구 수, 전체 백혈구 수, 헤마토크릿, 분화(Differential) 백혈구 수, 헤모글로빈 농도, 혈소판 수, 평균 혈구 헤모글로빈, 평균 혈구 양, 평균 혈구 헤모글로빈 농도, 망상적혈구, 응고 가능성(택1, 프로트롬빈 시간, 응고 시간, 부분 트롬보플라스틴 시간)
- (2) 생화학 검사 항목: 글루코오스 (야간 공복 후), 총 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 혈액 요소성 질소, 총 빌리루빈, 크레아티닌, 총단백질, 알부민, 글로불린, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파르트산염 아미노기 전이효소, 알칼리 인산가수분해효소, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 인, 염화물
- (3) 뇨 검사 항목 (선택사항): 외관(색상 및 혼탁도), 총 단백질, 용적, 글루코오스, 비중 또는 삼투압, 혈액/혈구, pH

주 5) 시험물질의 독성의 특성화를 위해 추가 평가 항목 :

Cholinesterase, 지질, 호르몬, 산/염기 균형, 메트 헤모글로빈(Methaemoglobin) 또는 하인츠(Heinz) 소체, Creatine kinase, 골수세포(bone marrow cytology), 트로포닌, lactate dehydrogenase, glutamate dehydrogenase, gamma glutamyl transpeptidase

주 6) 전체 부검 중에 보존할 기관 및 조직

- (1) 육안 병리검사시 적절한 고정액에 고정해야 한다.
- (2) 갑상선과 부고환의 중량을 정확히 측정하기 위해 결체조직 등을 제거하다보면 이러한 과정이 병리조직학적 평가를 방해할 수 있기 때문에 필요한 경우에만 중량을 달아야 한다.
- (3) 조직병리에 사용되는 왼쪽 폐는 온전하게 제거하여, 무게를 달고, 폐 조직이 유지되도록 확실히 하기 위해 20 cm ~ 30 cm의 물 압력에서 고정한다. 폐 침착 측정을 수행하는 회복군의 경우 왼쪽 및 오른쪽 폐 모두의 무게를 측정할 수 있다.
- (4) 육안 병리검사 및 장기 무게 측정이 완료된 장기 및 조직들은 가능한 부검이 수행되는 즉시, 사용할 접착제에 따라 다듬질 전에 24 시간 ~ 48 시간 이상, 10 % 중성 완충 포르말린액 또는 적절한 고정액에 고정시킨다.
- (5) 부검 조직 목록 : 대동맥, 골수(및/또는 새로운 흡인물), 맹장, 응고샘(선), 결장, 십이지장, 대퇴골 및 후슬관절, 담낭(존재하는 경우), 회장, 공장, 식도, 후신경구, 췌장, 부갑상선, 말초신경(좌골 또는 경골, 근육과 가까운 쪽), 뇌하수체, 전립선, 직장, 침샘, 정낭, 피부, 척수(경부, 중간 흉부 및 요추), 흉골, 위, 치아, 기도(용골을 통한 1개 세로 부분과 1개 가로 부분을 포함한 최소한 2개 단위), 방광, 후두(후두개의 바닥을 포함한 3개 단위), 림프절(침입구로부터 먼 쪽), 유선(암컷 및 수컷), 근육(넓적다리), 비인두 조직(최소한 4 개 부위; 1 개 비인두관 및 비강 연관조직 (NALT) 포함), 특히 잘 녹지 않는 미립자 시험물질에 대해서는 폐의 폐문 부위로부터 오는 림프절(면역학에 집중한 더 심층 검사 및/또는 연구를 하려면, 추가 림프절, 예컨대, 종격, 경부/악하 및/또는 귀부위로부터 오는 림프절), 표적기관, 모든 육안병변 및 종양 모두
- (6) 보존을 위해 잘 다듬어져야 하는 기관 및 조직 목록: 부신, 난소, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 심장, 신장, 간, 폐(늑막과 주기관지를 포함한 왼쪽 폐. 최소한 3 개 부위), 비장, 고환, 부고환, 흉선, 갑상선(고정 후에 트리밍 및 중량 측정), 자궁
- (7) 시험책임자의 판단에 따라 보존될 수 있는 기관 및 조직: 눈(망막, 시신경) 및 눈꺼풀, 하르더샘, 눈물샘 (케도외), 혀, 수뇨관, 요도

- (8) 최소한 비인두 조직의 4 개 부위를 검사해야 하며, 편평 상피, 이행 상피(무섬모 호흡기), 호흡기(섬모 호흡기) 및 후각 상피, 그리고 배수 림프 조직(NALT)을 적절히 검사할 수 있도록 하기 위해 그 중 하나에 비인두관이 포함되어야 한다. 후두의 3 개 부위를 검사해야 하며, 이 레벨 중 하나에 후두개의 바닥이 포함되어야 한다. 폐 외부 기관지의 분기 용골을 통한 1 개 세로 부분과 1 개 가로 부분을 포함한 기도의 최소한 2 개 부위를 검사해야 한다.
- (9) 시험물질의 이동(translocation)을 평가할 필요가 있다면 관련 조직의 입자침착은 보존된 조직병리학 조직 표본에서 측정할 수 있다. 또한 LALN에서의 입자 침착은 난용성 미립자를 시험할 때 항상 이동의 지표로 측정된다.

제12항 최기형성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질을 배자/태자의 기관형성기에 있는 임신동물에 투여하여 시험물질이 배자/태자의 발생 및 모동물에 미치는 영향에 관한 일반적인 정보를 제공하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 최기형성

배자/태자 발생기동안 구조적으로나 기능적으로 영구적 이상을 초래하는 화학물질의 성질

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

1.1.1. 동물종

- (1) 시험동물로서 설치류는 랫드를, 비설치류는 토끼를 사용하며 이외 다른 동물종을 이용할 경우에는 정당한 논리적 근거를 제시한다. 분만 또는 수태의 경험이 없는 젊고 건강한 암컷을 사용한다. 암컷과의 교미에 사용되는 수컷은 암컷과 동일한 종 및 계통을 사용한다.
- (2) 사육실의 온도는 설치류의 경우 $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 토끼의 경우 $18^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 이며, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 조명은 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취하도록 한다.
- (3) 연구 결과의 해석을 방해할 정도로 호르몬 활성 물질(예, 식물성 에스트로겐)

이 높게 함유된 사료 및 깔짚의 사용은 피하도록 한다. 식물성 에스트로겐 함량은 설치류 사료 g 당 Genistein 당량으로서 350 μ g을 초과해서는 안 된다.

(4) 교미하기에 적절한 케이지 환경을 제공하도록 하며, 교미가 끝난 암컷에게는 임신과 분만에 편안한 환경을 조성해 준다. 토끼의 경우에는 마리 당 개체별로 따로 사육한다. 각 동물에게 고유 식별 번호를 부여한다.

(5) 설치류의 경우 임신 0 일은 질전 및/또는 정자가 관찰되는 날이며, 토끼의 경우에는 교미한 날 또는 인공수정일을 임신 0 일로 한다.

1.1.2. 동물수

각 투여군 및 대조군은 부검 시 착상 부위가 확인되는 약 20 마리의 암컷을 확보하기에 충분한 수의 암컷으로 구성한다. 모동물 사망률이 10 %를 초과하는 경우에는 시험 수행이 적절하지 않으며 그 시험은 무효로 한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

시험물질을 배자/태자의 기관형성기 상태에 있는 모동물에 투여한 후 모동물의 영향, 사망, 장기의 구조적 이상 또는 배자/태자의 성장 변화에 대해 평가한다.

2.2. 시험물질

2.2.1. 용매

투여를 용이하게 하기 위하여 용매 또는 다른 첨가제를 사용하는 경우, 시험물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 대한 영향, 시험물질의 화학적 특성에 대한 영향, 사료 또는 음용수 섭취 또는 동물의 영향 상태에 미치는 영향 등을 고려하여야 한다. 용매는 발생 독성이나 생식 독성이 없어야 한다.

2.2.2. 용량

(1) 최소 3 단계 용량의 투여군과 동시 대조군을 둔다. 동물에게 심각한 고통을

주거나 사망을 초래하지 않는 범위 내에서 최고용량을 선정한다. 용량수준은 용량-반응 및 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) 또는 벤치마크용량(BMD, Bench Mark Dose)을 설정할 수 있는 수준으로 설정한다. 2 배 ~ 4 배의 용량 간격을 두는 것이 좋다.

- (2) 시험물질 또는 관련된 물질의 대사 및 독성동태에 대한 추가 정보뿐만 아니라 기존 독성 자료를 고려하여 용량 수준을 선택하여야 한다.
- (3) 동시 대조군을 두어야 하며, 처리군과 동일한 투여방법을 따라야 한다. 시험물질 투여 시 용매를 사용할 경우, 이 때 사용한 동일한 용매를 동시대조군에도 사용한다. 시험물질을 처리하는 것을 제외하고는, 대조군의 동물은 처리군의 동물과 동일한 방식으로 취급한다. 용매 대조군은 용량 군 중 최고용량 군에 사용한 용매의 양을 대조군에도 처리한다.

2.2.3. 한계시험

경구 용량으로 1,000 mg/kg 또는 동등 용량으로 단회 투여 후 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 시험물질의 독성이 예상되지 않는 경우에는 3 단계 용량을 투여할 필요는 없다. 흡입 또는 경피의 경우에는 시험물질의 물리화학적 특성상 노출이 가능한 최대 수준으로 하되, 피부의 경우 심각한 국소 독성이 나타나지 않는 수준으로 한다.

2.2.4. 투여방법

- (1) 경구투여를 원칙으로 하며 다른 투여 경로를 사용한 경우에는 정당한 사유가 있어야 한다. 시험물질은 매일 비슷한 시간에 투여한다.
- (2) 가장 최근 측정된 개별 체중을 기준으로 시험물질을 각 동물에게 투여한다. 시험물질 처리로 인하여 모동물에서 과도한 독성이 발견되는 경우 해당 동물은 인도적으로 안락사 시키며, 일부 임신 동물이 과도한 독성 징후를 보이는 경우에는 해당 용량군에 대해서는 시험중단을 고려하여야 한다.
- (3) 경구투여 하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로

최대 1 mL/100 g (체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g (체중)까지 허용한다. 동물의 체중을 고려한 일정 투여량 수준을 유지하기 위해 필요에 따라 투여 부피를 조정할 수 있다.

2.2.5. 투여기간

일반적으로 착상으로부터(예, 랫드의 경우 교미 후 5 일) 예정된 제왕 절개 전날까지 매일 투여한다. 예비 실험에서 착상 전의 손실 가능성이 높지 않다면 교미에서 예정된 부검 전일까지 임신 기간 전체를 포함하도록 처리를 연장할 수 있다. 시험물질에 의한 영향외의 다른 요인으로 인해 태아가 손실되는 것을 막기 위해서는 임신 동물이 스트레스를 받지 않도록 관리하여야 한다.

2.3. 관찰사항

2.3.1. 모동물

- (1) 시험물질 투여 후 영향이 나타날 것으로 예상되는 최대 기간을 고려하여 하루에 한 번 이상, 바람직하게는 매일 같은 시간에 모동물을 관찰한다. 사망률, 빈사상태, 행동 변화 및 독성 징후를 포함하여 동물의 상태를 기록한다.
- (2) 동물의 체중은 교미 첫날, 외부에서 임신동물을 공급받은 경우에는 늦어도 교미 후 3 일 이내에 체중을 측정하며, 아울러 투여 첫 날과 부검당일, 그리고 투여기간 중에는 매 3 일 마다 체중을 측정한다. 임신한 암컷 및 임신하지 않은 암컷의 체중 측정은 별도로 구분한다. 사료 섭취량은 3 일 간격으로 기록하며, 체중 측정 일수와 일치하여야 한다.
- (3) 사후 검사를 위해 출산 예정일 하루 전 암컷을 인도적으로 안락사 시킨다. 예정된 안락사 이전에 낙태 또는 조기분만의 징후를 보이는 암컷은 안락사 시키고 육안 관찰한다.
- (4) 시험 종료 및 시험 중에 사망하는 모동물에 대해 육안적으로 장기의 구조적인 이상 유무를 검사한다. 모든 모동물에 대해 갑상선 무게 측정 및 조직병리학적 검사를 실시한다.

- (5) 시험 종료 또는 사망 직후 가능한 신속히 자궁을 제거하고 동물의 임신 상태를 확인한다. 임신 중이 아닌 것으로 보이는 자궁은 임신하지 않은 상태를 확인하기 위해 추가 검사를 실시한다(예, 설치류에 대한 암모늄 이황화합물 염색법 및 Salewski 염색법 또는 토끼에 대해서는 적절한 대체 방법).
- (6) 자궁 경부를 포함한 임신 자궁의 무게를 측정한다. 시험 중 사망 동물의 임신 자궁 무게는 측정하지 않는다. 임신한 동물에 대해 황체 수를 조사한다. 자궁 내용물로부터 사망한 배자 또는 태자의 수 및 생존한 태자의 수를 검사하며 태자의 상대적 사망 시간을 추정한다.

2.3.2. 태자

살아있는 태자에 대해서 체중 및 항문생식기간 거리(AGD, Ano-Genital Distance)를 측정하고 성별을 판정한다. 단, AGD 측정은 설치류에 한하여 실시한다. 그리고 외형 및 내부기관의 육안적 검사와 골격검사 및 연조직 검사를 실시한다. 생식기계에 대해 주의 깊게 살펴보고 발생이상의 징후가 나타난 경우 이를 검사한다. 모든 태자에 대해 외관 관찰에 의한 외부성별과 생식선 등의 관찰에 의한 내부성별을 비교하여야 한다. 수컷 태자에 대해 불완전한 고환 하강/잠복 고환의 징후를 조사하여야 한다.

2.3.3. 혈액 표본 수집(랫드)

모든 혈액 표본은 적절한 조건에서 보관하여야 한다. 부검 당일 아침에 2 시간 내에 갑상선 호르몬 T4, T3 및 갑상선 자극 호르몬(TSH, Thyroid Stimulating Hormone)을 측정하기 위해 모든 모동물에게서 혈액을 채취한다. 임신하지 않은 암컷의 혈액 표본은 임신한 암컷과 별도로 구분한다. 시험자료의 질적 수준 관리를 위해 과거 대조군 자료의 수집과 분석물에 대한 편차(특히, 내분비계 기능과 관련된 지표)를 제시하도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

- (1) 개체별로 결과를 제시하여야 하며, 자료는 각 시험군 별로 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험자료는 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 임신한 암컷의 수, 독성 징후를 나타낸 동물의 수, 시작 시간, 지속기간, 심각도를 포함한 독성 징후에 대한 설명, 조직병리학적 변화의 유형 (갑상선) 태자 관찰의 유형 및 모든 관련 한배새끼 자료 등이다.
- (3) 수치적 결과는 적절한 통계 방법을 이용하여 평가한다. 통계 방법은 시험 설계 시 선택한다.

2. 시험결과의 평가

본 시험방법의 결과를 평가하기 위해 아래와 같은 정보를 포함하여야 한다.

- (1) 모동물 및 배자/태자 시험 결과; 시험물질 투여용량과 관찰된 시험결과와의 상관성 포함
- (2) 태자의 외부, 연조직 및 골격 변경에 대한 분류기준(Categorisation criteria) (실시한 경우)
- (3) 과거 대조군에 대한 시험자료
- (4) 백분율 또는 지수를 계산하는 데 사용된 원자료(Raw data)
- (5) 통계분석자료

3. 시험결과의 해석

본 시험 결과에 대한 해석은 아만성 독성, 생식 독성, 독성동태 및 기타 시험 결과를 두고 같은 맥락에서 해석하여야 한다. 본 시험결과에 대한 해석은 일반 독성이 나타나지 않을 때의 배자/태자 발생독성과 모동물의 영향으로 인해 나타나는 배자/태자 발생독성을 구분할 수 있다.

4. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

4.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

4.2. 시험책임자 및 담당자 성명

4.3. 시험물질

- (1) CAS 명, CAS 번호와 같은 화학적 동정, 구조식, 순도, 불순물의 화학적 동정 등
- (2) 안정성 및 균질성(알려진 경우)
- (3) 단일조성물질의 물리적 외양, 수용해도 및 물리화학적 성질
- (4) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질의 화학적 동정, 함유량 및 구성 성분의 물리화학적 성질

4.4. 용매 선정근거

4.5. 시험동물

- (1) 종, 계통
- (2) 동물의 수 및 주령
- (3) 공급처, 사육조건, 사료
- (4) 시험 시작 시 동물의 개별 체중

4.6. 시험조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질/사료의 조제내역, 최종 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내역에 대한 세부사항

- (4) 실제투여량(mg/kg(체중)/일) 및 사료/음용수 중의 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수(해당되는 경우에)
- (5) 환경 조건
- (6) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

4.7. 결과

4.7.1. 모체 독성 반응

- (1) 시험 시작 시 동물의 수, 생존 동물의 수, 임신한 및 유산한 동물의 수, 초기 분만 동물의 수
- (2) 시험 기간 중 사망한 경우 그 날짜, 또는 시험종료시 까지의 생존 여부
- (3) 시험 일정에 따른 치사기간 까지 생존하지 못한 동물의 자료(군 간 통계 비교에는 비포함)
- (4) 비정상적인 임상 징후를 보인 날짜 및 그 후의 진행 경과
- (5) 체중, 체중 변화 및 임신상태의 자궁 무게, 체중 변화에 따라 보정된 임신상태의 자궁 무게
- (6) 사료 및 음용수 섭취량(측정한 경우)
- (7) 랫드 모동물로부터 갑상선 호르몬 T4, T3, TSH 및 기타 호르몬 농도(측정한 경우), 호르몬에 사용된 호르몬 키트 또는 항체에 대한 세부사항, 실험실의 과거 대조군 자료(평균 및 표준편차), 검출한계/정량한계
- (8) 자궁 무게를 포함한 부검 결과
- (9) 모체 영향 및 배자/태자 영향에 대한 무영향관찰용량값(NOAEL)

4.7.2. 착상에 대한 발생 종말점

- (1) 황체수
- (2) 착상 수, 생존 및 사망 배자/태자 수, 재흡수의 수/백분율
- (3) 사전 및 사후 착상 손실의 수/백분율

4.7.3. 생존 태자에 대한 발생종말점

- (1) 생존한 태자의 수/백분율
- (2) 성비
- (3) 태자 체중(성별로 구분되면 좋음)
- (4) 설치류 태자의 항문-생식기 간의 거리
- (5) 외부, 연조직, 골격 기형 및 기타 관련 조직의 변화
- (6) 분류 기준(가능한 경우)
- (7) 개체별 기형 및 관련 변화의 유형 그리고 발생률. 아울러 외부, 연조직 또는 골격 변화가 있는 태자 및 한배새끼의 총 수/백분율(수컷 태자의 경우 불완전한 고환 하강/잠복 고환의 징후는 표시되어야 함)

4.7.4. 결과에 대한 토론

4.7.5. 결론

제13항 2 세대 생식독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 생식선기능(Gonadal function), 성주기(Oestrus cycle), 교미행동(Mating behavior), 수태(Conception), 임신(Gestation), 분만, 수유, 이유, 차산자의 성장 및 발육을 포함한 수컷 및 암컷 생식계의 완전성(Integrity) 및 기능(Performance)에 대한 화학물질 및 혼합물의 영향과 관련 있는 정보를 얻는데 목적이 있다. 즉, 차산자(F1) 세대의 성장 및 발달에 대한 연구뿐만 아니라, 수컷 및 암컷 생식계의 완전성 및 기능과 차차산자(F2) 세대의 성장 및 발달에 대한 화학물질의 영향을 관찰할 수 있다.

2. 정의

2.1 생식 독성(Reproduction toxicity)

차세대에 대한 유해한 영향 또는 암수의 생식 기능 장애 혹은 능력 장애

2.2 모체 독성(Maternal toxicity)

직접 혹은 간접적으로 나타나는 수태한 암컷에 대한 부작용

2.3 번식능 장애(Impairment of fertility)

수컷 혹은 암컷의 생식 기능 혹은 능력 장애

2.4 발생 독성(Developmental toxicity)

차산자의 출생 전, 주산기 그리고 출생 후에 관찰되는 구조적 혹은 기능적 장애를 나타내는 생식 독성의 징후

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 실험동물

시험에 사용되지 않은 건강하고 임신 경험이 없는 랫드(투여시 5 주령 ~ 9 주령)를 사용한다. 랫드 외의 실험동물을 사용할 경우 그 실험동물을 사용한 적절한 사유 및 정당성을 제시하여야 한다. 시험에 사용되는 동물들의 무게 차는 최소로 하고, 동물 개체 무게와 각 암수의 평균 무게와의 차는 $\pm 20\%$ 이하로 한다. 모체 및 차산자 각각에 대해 고유 식별 번호를 부여하고, 각각의 F1이 출생한 한배새끼는 다른 한배새끼와 구분하여 기록한다.

1.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 상대습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하고 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 음용수를 적절히 공급한다. 사료를 이용하여 시험물질을 투여하는 경우 시험물질이 사료에 잘 분산되도록 한다.

각 동물을 개별적으로 사육하거나 작은 동물은 성이 같은 동물군으로 사육할 수 있지만 수태한 암컷은 케이지 당 한 마리씩 사육한다. 그 밖의 동물실 환경조건은 일반적인 환경기준에 따른다.

1.3 시험물질 및 투여

위관투여법을 통한 경구 투여 혹은 사료, 음용수를 통해 시험물질을 투여할 수도 있다. 다른 경로를 통해 투여할 경우 경로설정에 대한 정당성을 제시한다. 경구 투여의 경우 매일 같은 시간에 투여하고, 동물의 체중 당 일정한 양으로 투여하기 위해 적어도 1 주일에 한 번은 각 실험동물의 체중을 측정하여야 한다. 이유기 동물은 수유를 통해 시험물질이 간접적으로 투여되고, 사료/음용수를 사용하는 경우 수유가 끝나는 마지막 주에 직접적으로 투여된다.

시험 물질의 최대 1 회 경구 투여량은 수용액의 경우 2 mL/100 g(체중), 비수용액의 경우 1 mL/100 g(체중), 옥수수기름의 경우 0.4 mL/100 g(체중)를 초과하면 안 된다. 사료 혹은 음용수를 통해 투여되는 경우 동물의 체중 당 일정한 투여량을 적용한다.

1.4 시험군의 구성 및 투여용량 설정

최소 3 개의 투여군과 1 개의 대조군으로 각 군당 암수 각각 20 마리 이상(수태한 암컷의 최소수는 20 마리)로 구성한다.

투여농도 설정은 급성 독성 시험 혹은 반복 투여독성 시험 결과, 그리고 시험물질 혹은 관련 있는 물질에 유용한 모든 독성 및 역학 자료를 고려한 후 투여농도를 결정한다. 독성 영향은 유발하지만 죽거나 심한 고통은 주지 않는 농도를 최대 투여농도로 선택해야 한다. 가능한 2 배 ~ 4 배의 공비를 두고(사료에 섞어 투여할 경우 3 배 이하), 투여농도를 줄이는 것이 이상적이다. 용량간격이 대단히 큰 경우(즉, 공비가 10 이상), 최저용량 시험군을 하나 더 둔다. 시험 물질을 투여할 때 용매를 사용하는 경우, 사용된 최대용량의 용매를 대조군에게 투여한다.

경구로 1 회 투여농도가 최소 1,000 mg/kg(체중)/day이거나 동일한 양의 시험물질을 사료 혹은 음용수에 첨가·투여하여 어떠한 독성 영향도 발견할 수 없거나, 구조적으로 관련 있는 화합물에서 얻은 자료를 근거해 독성이 발견되지 않는 경우에는 한계시험을 수행할 수 있다.

2. 시험방법

2.1 원리

수컷(P)은 성장 기간 및 최소한 한 번의 완전한 정자 형성 주기(마우스의 경우 약 56 일, 랫드의 경우 약 70 일 이상) 동안 투여하고, 암컷(P)은 성장기간 및 완전한 생식주기(임신시기, 임신기간 및 F1의 수유기 포함)동안 단계적 용량의 시험물질을 각 군에 투여한다. F1의 경우 이유기, 성장기, 성체기 및 교미기를 거쳐

F2의 수유기에 이를 때까지 시험 물질을 매일 투여한다. 이 시험을 통해 수태부터 F1 및 F2의 성장 및 발생, 수태능, 번식능, 모체 및 수유 행동에 대해 예상되는 시험물질의 영향을 관찰할 수 있다. 기존 독성정보가 있는 경우 그 자료를 바탕으로 시험물질 투여 및 관찰 일정을 변경하여 수행할 수도 있다.

수컷의 경우 2 주간의 교미기가 지나고 생식 영향에 대해 더 이상 평가할 필요가 없다면 안락사 후 영향을 관찰한다.

2.2 교미

모체(P)는 최소 5 일 동안 순화 후, 교미시기 2 주 후까지 수컷과 암컷을 같이 사육하고 일반적으로 암수 1 : 1로 진행한다. 정자 혹은 질전(Vaginal plug)이 관찰되면 임신 0 일로 정의한다.

F2를 생산하기 위해서, 같은 용량 투여군의 다른 한배새끼 중 암수인 F1을 각각 선택하여 교미시킨다. 교미용 F1의 경우 몸무게 및 외관적 관찰로 판단하여 성성숙 동물을 선택한다.

수태하지 못한 암수의 경우 추가교미, 생식기관의 미시적 조사, 발정주기 또는 정자형성 등 여러 결과를 바탕으로 불임의 원인을 조사한다. 시험물질로 인한 한배새끼의 크기 및 영향이 모호한 경우, P 또는 F1 성체를 다시 교미시켜, 두 번째 한배새끼를 생산하여 관찰한다. 이때 교미시키지 않은 한배새끼의 다른 성별을 사용한다. 한배새끼는 이유기까지 모체와 함께 사육하고 한배새끼의 크기 측정은 선택사항이다.

2.3 관찰사항

시험 기간 동안 적어도 하루에 한번 같은 시간에 임상증상을 관찰하고, 독성 징후가 관찰됐을 때는 더 자주 관찰해야 한다. 행동 변화, 분만이 어렵거나 지연되는 징후, 폐사를 포함한 모든 독성 징후를 시간 및 기간을 포함하여 기록한다. 그리고 1 주일에 한번 각 동물에 대해 체중측정과 병행하여 상세한 임상증상을 관찰한다.

임신 0 일부터 계산된 수태기간을 계산하고, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 및 분만 4 일 후 생존한 F1, 사망한 F1, 작은 F1 수 및 성별을 조사하고 체중 및 어미와 F 모두 이상행동을 기록한다.

2.3.1 체중 및 사료/음용수 섭취량

투여 첫날, 수컷과 암컷의 체중을 측정 한 후, 시험이 끝날 때까지, 적어도 1 주일에 한번 모체동물(P 및 F1)의 체중을 측정한다. 임신 0 일, 7 일, 14 일, 20 일 또는 21 일 후와, 수유기 중 한배새끼의 몸무게를 측정하는 날 그리고 동물이 폐사한 날에 모체동물(P 및 F1)의 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 교미 후, 임신기간, 수유 기간 동안 적어도 1주일에 한번 측정하고 시험물질이 음용수를 통해 투여되는 경우 이 기간 동안 음용수 섭취량도 측정해야 한다.

2.3.2 정자 관찰지표

시험 종료 시 모든 P 및 F1 수컷의 고환 및 부고환 무게를 기록하고, 조직 병리학적 검사를 위해 모든 기관을 고정시킨다. 각 P 및 F1 수컷 동물군 중, 최소한 수컷 10 마리의 고환을 균질화시킨 정세포와 꼬리 부고환의 정자를 사용하여 시험한다. 시험물질의 노출과 관련 있는 영향이 관찰되거나, 정자 형성에 대해 예상되는 영향에 관한 자료가 있는 경우, 각 투여군의 모든 수컷에 대해 정자 평가를 실시한다. 그렇지 않은 경우 대조군과 고용량 투여군의 P 및 F1 수컷 정자에 대해서만 관찰해도 무방하지만 고용량 투여군에서 시험물질과 관련된 영향이 관찰되었다면 저용량 투여군도 분석해야 한다.

부고환(또는 정관) 정자를 이용하여 형태학적 평가를 실시한다. 정자(최소한 샘플 당 200 마리)를 습윤법으로 고정시킨 후 정상 혹은 비정상으로 분류한다. 융합, 두부(Head)의 소실, 두부기형 및/또는 기형꼬리는 부고환 정자 형태학적 이상의 현상이다. 정자검사는 부검 후 즉시 수행하거나 비디오나 디지털 기록에 의한 컴퓨터 정보처리 결과를 근거하여 수행할 수 있다.

2.3.3 차산자/차차산자

분만(수유 0 일째)된 후 바로 각 한배새끼의 수, 성별, 사산한 수, 정상 분만된 수 및 성별, 이상 F1의 수를 기록한다. 수유 0 일째 폐사한 F1는 사산원인을 파악하여 보관하고, 생존한 개체는 체중을 측정한다. 이후 수유 4 일째, 7 일째, 14 일째, 21 일째 체중을 측정하고 모든 동물의 이상증상을 관찰하고 기록한다. 몸무게 증가에 따른 차산자의 성성숙(질개구 또는 귀두포피 분리)과 기능검사(운동, 감각기능 및 반사적 발생)관련 결과를 함께 평가한다. F1의 성 비율 혹은 성적 성숙도 시기에 변화가 시작되는 경우, 출생 0 일째 F2의 생식기와 항문 사이의 거리를 측정한다.

2.3.4 장기무게 측정

시험 종료 시 다음의 모든 P 및 F1 모체동물의 장기무게를 측정한다.

- 자궁, 난소, 고환, 부고환(전체 및 미부), 전립선/응고샘/체액, 정낭, 뇌, 간, 신장, 비장, 뇌하수체, 갑상선, 부신 등

시험 종료 후, 육안적 관찰이 끝난 F1 및 F2 차산자의 몸무게를 측정한 후, 무작위로 선택한 한 개체의 F1/성별/한배새끼의 뇌, 비장, 흉선의 무게를 측정한다.

2.3.5 조직 병리학적 관찰

시험 종료 시 또는 시험 기간 중 폐사한 개체는 모두 구조적 이상 혹은 병리학적 변화에 대해 육안으로 관찰하고 다음의 절차에 따라 조직병리학 검사를 실시한다.

2.3.5.1 모체동물

모체동물(P 및 F1)의 생식기관 중 암컷의 경우 질, 자궁경부를 포함한 자궁, 난소를, 수컷의 경우 한쪽 고환(Bouin 고정제 사용), 한쪽 부고환, 정낭, 전립선, 응고샘을 고정한다. 교미용으로 사용된 P 및 F1 동물의 알려진 표적장기도 고정한다. 교미용으로 사용된 모든 용량 투여군 및 대조군의 P 및 F1 동물은 고정된 모든 기관에 조직병리학적 검사를 수행하여 무영향관찰용량(NOAEL)을 결정한다. 시험

물질 노출과 관련된 영향을 확인하기 위해, 고환에 대해 상세한 조직 병리학적 시험을 수행하고, 이때 종단면 평가를 할 수 있는 두부, 몸체 및 미부가 손상되지 않은 부고환을 사용한다. 그 외 백혈구 침입, 세포 형태 및 변종 세포 형태의 변화, 정자의 식균 작용을 확인하고 Periodic acid-schiff(PAS) 및 헤마톡실린 염색약을 사용해, 수컷의 생식 기관을 분석한다.

수유 후 난소는 초기(Primordial) 및 생성 난포뿐만 아니라, 수유기 황체를 포함하고 있어 조직병리학적 검사를 통해 초기 난포군의 질적 감소를 확인한다. F1 암컷의 초기 난포군에 대한 작은 생장 난포군을 포함한 초기 난포군의 수를 측정하는 정량 분석도 수행한다.

2.3.5.1 이유기의 차산자

외관상 비정상 혹은 임상적 징후를 보이는 모든 차산자의 모든 비정상적인 조직 및 표적장기뿐만 아니라, 최소한 F1 및 F2에서 무작위로 선택한 한 개체의 F1/성별/한배새끼(교미용 제외)를 고정시킨 후, 조직 병리학적 검사를 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험 시작 시 각 시험군과 각 세대의 동물 수, 시험 기간 동안 사망하거나 인도적으로 처사시킨 동물의 수와 그 시기, 수정한 동물의 수, 수태한 암컷의 수, 독성 징후를 보이는 동물의 수, 모든 독성 영향의 시작 및 기간 및 심각도를 포함한 관찰된 독성 징후에 대한 설명, 조직 병리학적 변화의 형태, 관련된 모든 한배 새끼에 관한 데이터가 기재된 표로 작성해 요약한다. 신뢰성 있는 통계 방법을 사용해 결과를 정량 분석한다. 데이터 분석을 위해, 용량-반응 통계 모델을 사용할 수 있으며 충분한 분석 방법과 사용한 컴퓨터 프로그램 정보를 시험보고에 포함한다.

2. 결과의 평가

시험물질 투여군과 대조군과의 관계, 이상의 발생 및 심각성뿐만 아니라, 전체적 이상 영향, 확인된 표적기관, 불임, 임상증상, 영향 받은 생식 및 수태 능력 및 한배새끼의 행동, 체중 변화, 폐사에 대한 영향, 기타 모든 독성 영향이 평가에 포함된다. 또한 시험물질의 생식독성관련 무영향관찰용량(NOAEL)과 성장 및 성적 성숙을 포함한 생식, 분만, 수유, 출생 후 발육의 부작용에 관한 결과를 평가한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

- IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학물질명
- 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도
- 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용해도, 물리화학적 성상
- 물이 아닌 용매를 사용하였을 때, 선택 이유에 대한 적정성

3.4 시험동물

- 사용된 종/계통
- 동물의 수, 주령, 성별
- 사육조건, 시험을 시작할 때, 각 동물의 체중

3.5 시험조건

- 용량 선택에 대한 이유
- 시험 물질 배합/사료 제조에 대한 상세한 설명, 결정 농도, 배합과 제조의 안정성 및 균질성
- 시험 물질 투여에 대한 상세한 설명
- 섭취된 사료/음용수에 포함된 시험 물질 농도를 실제 투여량(mg/kg/day)으로 전환
- 사료 및 음용수 관련 상세한 설명

3.6 시험결과

- 사료 및 음용수 섭취량
- 사료효율(체중증가량/사료섭취량), P와 F1의 시험물질 섭취량(교배기 및 수유기의 마지막 3 일 제외)(권장사항)
- 시험물질의 흡수관련 자료(권장사항)
- 교미용으로 사용된 P 및 F1의 체중
- 한배새끼 및 F1 체중
- 부검시 체중 및 모체/부체 동물의 절대/상대 장기 중량
- 임상 관찰의 특성, 심각성, 기간
- 시험 기간 동안 시험동물이 폐사한 시기 혹은 생존한 동물의 부검시기
- 번식력, 수태, 기타 모든 독성 징후를 포함한 성 및 투여별 독성 반응 데이터
- 생식, F1, 출생 후 성장 등에 대한 독성 혹은 다른 영향
- 부검시 육안적 관찰 결과
- 모든 장기의 조직 병리학적 검사 관찰 결과
- P 및 F1 암컷의 일반적인 배란 주기 횟수 및 주기 기간
- 부고환 꼬리에 있는 정자의 총수, 직진 운동하는 정자의 비율, 형태학적으로 정상인 정자의 비율, 비정상인 정자의 비율
- 교미할 때까지의 일수를 포함한 교미 기간

- 수태기간
- 착상한 태자 수, 황체의 수, 한배새끼 크기 및 체중
- 생존한 F1 및 착상 후 죽은 태자 수
- 관찰된 전체적인 이상을 가진 F1 수, 작은 F1 수
- F1의 신체적 경계표(Physical landmark), 다른 출생 후 발육 자료, 평가된 신체적 경계표에 대한 정당성
- 적용 가능한 새끼 및 성체에 대한 기능적 관찰 자료
- 결과에 대한 적절한 통계 방법
- 모성 행동 및 F1에 미치는 영향에 대한 무영향관찰용량을 포함한 결론

3.7 결과의 고찰 및 결론

제14항 독성동태시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 흡수, 분포, 배설 및 대사에 관한 독성동태학 (Toxicokinetics)적 연구로부터 얻은 정보를 토대로 독성을 평가하고 해석하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1. 독성동태학 (Toxicokinetics)

물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 관한 연구

2.2. 흡수 (Absorption)

투여물질이 체내에 들어오는 과정

2.3. 분포 (Distribution)

흡수물질 및 그 대사체가 체내에서 순환하고 분산되는 과정

2.4. 대사 (Metabolism)

투여물질이 효소 및 비효소 반응을 통하여 체내에서 구조적으로 변화하는 과정

2.5. 배설 (Excretion)

투여물질 및 그 대사체가 체외로 제거되는 과정

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

건강한 동물 성체를 시험 전 5 일 이상 시험조건에서 순화시킨다. 시험에 사용되는 동물은 무작위로 선정한다. 미성숙 개체 또는 임신한 개체를 사용할 경우에는 시험의 목적과 특별한 사유를 제시하여야 한다.

1.1.1. 시험종의 선택

하나 또는 그 이상의 동물종을 시험에 사용할 수 있다. 동일한 시험물질에 대해 다른 독성 연구에서 사용되거나 사용이 권유되는 시험종을 선택하는 것이 바람직하다. 설치류를 시험에 사용하는 경우, 개체별 체중이 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다.

1.1.2. 수량 및 성별

1.1.2.1. 흡수 및 배설 연구를 위해서는 대조군 및 각 처리군에 대해 최소 4 마리로 시작한다. 시험에 사용되는 성별은 정해져 있지 않으나, 성별을 구분해서 시험해야 할 특별한 경우에는 한쪽 성만을 구분해서 노출할 수 있다. 성별에 따른 반응의 차이가 인정될 때는 암수 모두를 사용하여야 한다. 이때 각 성별로 처리군당 4 마리 이상을 사용한다. 비설치류의 경우에는 처리군당 4 마리 이하로 할 수 있다.

1.1.2.2. 조직내 분포를 연구하는 경우, 대조군 및 처리군에서의 최초 시험개체수는 시험과정에서 관찰하는 시점의 횟수와 각 시점에 관찰하는 동물의 수를 고려하여 결정한다.

1.1.2.3. 대사를 연구하는 경우, 개체 수는 실험의 목적에 따라 시험자가 적절하게 결정한다.

1.1.2.4. 시험물질을 반복적으로 노출시키거나 여러 시점에서 관찰하는 시험의 경우, 관찰시점의 횟수 및 관찰을 계획한 동물의 수 등을 고려하여 처리군의 개체수를 결정한다. 그러나 최소한 2 마리 이상 사용하도록 한다.

1.1.3. 사육 및 사료 조건

1.1.3.1. 실험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 상대습도는 30 % ~ 70 %를 유지하도록 한다.

1.1.3.2. 실험동물들은 적절한 케이지에 사육한다(시험목적에 따라 필요한 경우 대사케이지에 사육한다).

1.1.3.3. 조명은 하루 12 시간(명)/12 시간(암) 조건을 둔다.

1.1.3.4. 설치류의 경우, 사육과정에서는 음용수를 자유롭게 섭취시키고, 먹이는 일반적인 실험용 사료를 제공한다. 비설치류의 경우, 해당 동물에 적절한 사육조건에 따라 사육한다. 어떠한 사료를 제공하더라도 사료의 성분에 대한 정보를 확보해야 하며, 사료 조성은 시험물질의 성분에 영향을 주지 않아야 한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

시험물질은 적절한 경로를 통하여 체내에 투여하며, 목적에 따라 처리군에 일회 또는 반복적으로 투여한다. 물질 투여 후, 체액, 조직 또는 배설물에서의 해당 시험물질 또는 시험물질의 대사체를 분석한다.

2.2. 시험물질

시험물질이 식별되도록 표지하거나 표지하지 않는 방식으로 노출시킬 수 있다. 방사능 동위원소를 써서 식별하는 경우, 시험물질의 거동에 대한 정보가 제공될 수 있도록 동위원소를 시험물질에 표지하도록 한다.

2.3. 투여방법

2.3.1. 투여는 해당물질을 대상으로 한 다른 독성시험에서와 동일한 투여경로를 선택하고, 또한 다른 시험에서와 동일한 용매를 사용하는 좋다. 위관투여법 또는 사료에 시험물질을 섞어서 경구 투여하는 방법을 일반적으로 사용한다.

2.3.2. 위관투여법 또는 사료에 시험물질을 섞어 투여하는 경우에 흡수율 차이를 고려하여 투여한다. 투여되는 시험물질의 양을 정확히 계산하도록 한다.

2.3.3. 경구투여 외에도 일정 기간 동안 실험동물의 피부에 바르는 피부노출 또는 흡입을 통한 노출을 통해 시험물질을 투여할 수 있다.

2.3.4. 시험물질 투여 직후의 흡수 및 분포 양상을 확인하기 위해서 해당 물질을 정맥으로 주사하는 방법을 사용할 수 있다.

2.3.5. 시험물질 용매는 시험물질의 영향을 방해하지 않도록 선정한다.

2.4. 용량

단회투여를 실시하는 경우, 최소한 두 개 이상의 처리군 농도를 두도록 한다. 이때 독성이 나타나지 않는 농도를 저농도로 하고, 독성동태학 매개변수에 변화를 가져오거나 독성영향이 나타날 수 있는 농도를 고농도로 설정하도록 한다. 반복투여를 실시하는 경우에는 저농도만을 설정하여 수행할 수 있으나, 필요한 경우 고농도를 추가로 설정하여 시험한다.

2.5. 시험의 실시

동물의 무게를 측정된 후, 다음의 흡수, 분포, 배설 및 대사 등의 시험목적에 맞게 시험물질을 투여한다.

2.5.1. 흡수

투여한 시험물질의 흡수율과 흡수량을 다음과 같이 다양한 방법으로 결정할 수 있다. 이때 투여경로, 흡수율 및 흡수량이 검증된 물질을 대상으로 한 대조군을 설정, 이와 비교하여 결정할 수 있다.

- (1) 배설물(소변, 담즙, 대변, 호기) 또는 사체에 잔류하는 시험물질 또는 대사체량 측정
- (2) 처리군 및 대조군 (필요시 양성대조군 포함) 간의 생물학적 반응(예, 급성 독성시험) 비교

- (3) 처리군과 대조군에서의 신장을 통한 시험물질 및 대사체의 배출량 비교
- (4) 처리군과 대조군에서의 시험물질 또는 대사체의 혈장치와 시간곡선 내의 면적 계산값에 대한 상호비교

2.5.2. 분포

시험 물질의 분포 양상을 분석하기 위해 다음의 두 가지 모두 또는 두 가지 중 하나의 접근방법을 사용한다.

- (1) 전신 방사선 촬영술을 이용하여 유용한 정량적 정보를 획득
- (2) 시험물질 노출 후, 시간별로 동물을 부검하여 각 장기 및 조직에서의 시험 물질 또는 대사체의 농도와 양을 확인함으로써 정량적 정보를 획득

2.5.3. 배설

- (1) 배설 연구에서는 소변, 대변 및 호기, 경우에 따라 답즙을 채취한다. 이러한 배설물에서의 시험물질 또는 대사체의 양은 노출 후 수차례 측정하도록 한다. 측정 횟수는 시험물질 노출 후 투여된 물질의 약 95 %가 배출될 때까지 또는 투여 후 7 일 동안 수차례 측정한다.
- (2) 수유기의 실험동물을 사용하는 것과 같은 특별한 경우, 실험동물의 모유에서 배출되는 시험물질의 배출량을 측정할 수 있다.

2.5.4. 대사

- (1) 대사연구를 통한 대사체 구조의 확인시험은 대사경로 및 과거시험에서의 의문점에 대한 해답을 구하기 위하여 수행한다.
- (2) 대사경로에 대한 정보를 얻기 위해서는 시험관 내 시험(*In vitro* test)을 추가로 실시할 수 있으며, 보다 정확한 대사정보를 습득하기 위하여 독성 및 생화학적 연구를 수행할 수 있다(예를 들어, 대사효소체계에 대한 효과, 내인성 비단백질성 - SH 화합물의 고갈 및 고분자와의 결합 등).

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

1.1. 결과의 처리

대조군 및 각 처리군에 대해 시간, 농도, 조직, 기관(장기) 등과 관련된 측정치의 평균 및 통계적 변이값을 산출하여 표시한다. 가능한 경우, 데이터를 표로 작성하고, 필요하면 그래프를 추가한다. 흡수 정도 및 배설량, 배설 속도는 적절한 방법을 통하여 계산한다. 대사연구의 경우, 대사체의 구조를 확인하고 대사 경로를 표시한다.

1.2. 결과의 평가

1.2.1. 흡수

시험물질의 흡수에 대한 연구 결과는 급성독성을 평가하거나 반복투여독성 연구를 위한 시험 계획에 도움을 줄 수 있다. 시험 물질이 흡수되지 않거나 급성독성을 나타내지 않는다면(예, 폴리머 종류), 더 이상 반복투여 연구가 필요하지 않음을 제안할 수 있다.

1.2.2. 분포

조직 및 기관(장기)에 대한 시험물질의 분포양상을 확인함으로써 반복투여독성에 대한 연구 및 평가에 도움을 제공할 수 있다. 임신동물에 대한 분포조사를 통해 기관형성기의 임신모체에 노출된 시험물질이 태반을 어느 시점에서 어느 정도 통과하는지 측정할 수 있다. 또한 분포 연구의 시험데이터를 통하여 시험물질이 신체의 어느 조직 또는 기관(장기)에 축적되는지를 확인할 수 있다.

1.2.3. 배설

시험물질의 배설 양상을 확인함으로써 반복투여 연구 및 평가에 도움을 제공할 수 있다. 배설량 및 배설 속도를 평가함으로써 시험물질 또는 대사체가 체내에 잔류하는지 여부를 조사할 수 있다. 시험물질 또는 대사체의 잔류 여부는 독성반응의 변화와 관련을 보일 수 있다.

1.2.4. 대사

1.2.4.1. 시험 물질의 대사 양상 및 대사 속도를 확인함으로써, 해당 물질의 만성 독성 연구결과를 해석하는데 도움을 줄 수 있다. 이와 같은 연구를 통해 투여량 범위에서 독성대사 매개변수에 어떠한 변화가 나타나는지에 대한 확인이 가능하다. 만성독성시험을 위한 시험물질의 용량 선정 시 용량 의존적 대사반응에 대한 정보를 토대로 이루어질 수 있다.

1.2.4.2. 반복투여 조건의 독성반응에서 확인된 변화들은 대사효소의 유도과 관련될 가능성이 있다.

1.2.4.3. 동위원소 표지를 통해 식별 가능한 시험물질의 투여 후, 고분자 물질과 결합한 동위원소량을 검출함으로써 중간대사체 또는 반응 중간산물에 대한 정보를 얻을 수 있다.

1.2.4.4. 시험물질이 체내 - SH 화합물을 고갈시키는 지 여부가 확인되는 경우, 독성영향이 체내에서 활성화된 대사체에 의한 것인지 여부를 평가하는데 도움을 제공할 수 있다. 또한 이는 반복투여 연구를 위한 용량 설정에 활용될 수 있다.

2. 시험결과의 보고

수행된 독성동태 시험의 종류에 따라 결과보고서는 다음과 같은 정보를 포함하도록 한다.

2.1. 동물의 종과 계통 및 개체수

2.2. 방사능 동위원소로 표지한 경우 표지된 시험물질 특성 또는 대조물질의 특성

2.3. 용량 및 투여 간격

2.4. 투여 경로 및 사용된 용매

2.5. 사료

2.6. 생물학적 시료(호흡으로 배출된 공기 포함)에서 시험물질 또는 대사체 확인 방법

2.7. 실험동물의 성별, 용량 투여 계획, 시간, 조직, 기관(장기)에 대한 측정치를 포함한 도표

2.8. 시간별 흡수속도 및 배설 속도

2.9. 생물학적 시료에서의 대사체 확인 방법

2.10. 대사와 관련된 생화학적 분석 방법

2.11. 예상되는 대사 경로

2.12. 다음의 정보 또는 과정을 토대로 시험결과에 대한 해석과 고찰을 실시한다.

- (1) 시험물질의 흡수에 관한 정보를 토대로 경구, 피부, 흡입 및 기타 경로를 통해 실험동물 체내로 도입되는 물질의 양 및 속도를 평가한다.
- (2) 시험물질의 분포에 관한 정보를 토대로 실험동물의 각종 조직 및 장기에서 흡수된 시험물질 또는 대사체가 순환하고 분포하는 양상을 평가한다.
- (3) 시험물질의 배설에 관한 정보를 토대로 동물 체내에서 투여된 시험물질 또는 대사체가 제거되는 속도와 양을 평가한다.
- (4) 시험물질의 대사에 관한 정보를 토대로 투여된 시험물질 또는 대사체가 효소 및 비효소 반응을 거쳐 구조적으로 어떻게 변하는지를 평가한다.

제15항 급성 경구독성시험(고정용량법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험동물의 보호를 위해 치사량 이상의 화학물질 사용을 가급적 피하고, 치사량 이하의 용량에서 경구 투여하여 독성증상을 관찰하는데 목적을 둔다.

2. 정의

2.1. 급성 경구독성

시험물질을 24 시간 이내에 1 회 또는 수회 경구투여한 후 단시간 내에 나타나는 유해영향(Adverse effects)

2.2. 용량(Dose)

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 체중 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.3. 빈사 상태(Moribund state)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.4. 지연사망(Delayed death)

시험물질 투여 후 48 시간 이내에 사망 또는 빈사상태에 도달하지는 않으나 그 후 14 일간의 관찰기간 동안 사망하는 경우

2.5. GHS (Globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 체계

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

연령이 8 주령 ~ 12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다. 암컷은 분만경험이 없고 현재 임신 중이지 않은 것을 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다.

1.2. 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암/수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 음용수를 적절히 공급한다.

1.3. 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용성 액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, 옥수수기름) 또는 기타 다른 용매를 사용한다. 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

예비시험에서 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함)에 대해 여러 시험용량의 독성효과를 조사하고 그 결과로부터 최소 치사량 및 용량-반응 관계를 확보한다. 본시험에서는 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함)의 동물을 사용하여 고정용량(5 mg/kg , 50

mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg)에 대해 단계적으로 시험한다. 시작 용량은 예비 시험 결과에 근거하여 선정하는데 사망과 같은 심각한 독성을 유발하지 않으나 그 외의 독성 증상이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다. 시작 용량의 경과에 따라 다음 용량을 결정한 후 단계적으로 투여한다.

2.2. 시험물질의 투여

2.2.1. 경구 투여하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g까지 허용한다.

2.2.2. 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시한다. 이때 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.

2.2.3. 시험물질 투여 전날 저녁부터 먹이 공급을 중단하고 체중을 측정한다(마우스의 경우 시험물질 투여 3 시간 ~ 4 시간 전부터 먹이공급을 중단한다). 시험물질은 절식 후 투여 당일 측정된 체중을 기준으로 경구투여한다. 경구투여 후 3 시간 ~ 4 시간 후(마우스의 경우는 1 시간 ~ 2시간 후)부터 먹이를 공급한다. 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 음용수와 사료를 적절히 제공한다.

2.3. 예비시험

2.3.1. 시험물질 투여 후 적어도 14 일 동안 관찰한다.

2.3.2. 예비시험의 시작 용량은 독성 증상을 관찰할 수 있을 것으로 예측되는 용량으로써 고정용량(5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg) 가운데 하나를 선택하여 한 마리씩 투여하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 농도에서 예비시험을 실시하거나 본 시험의 농도를 설정한다. 예비시험의 농도 선정은 시험물질 또는 시험물질과 관련이 있는 물질의 독성자료를 바탕으로 한다.

2.3.3. 시작 용량을 선정하기 위해서 해당 물질 또는 유사 물질의 독성정보가 없는 경우 처음에 300 mg/kg 용량으로 시작한다.

2.3.4. 만일 2,000 mg/kg 이상의 농도에서 실험동물이 사망하지 않는 경우 예비시험을 중단하고 본시험을 2,000 mg/kg에서 실시한다.

만일, 최소 고정용량인 5 mg/kg에서 처음 투여한 1 마리의 동물이 사망하면 시험을 중단하고 GHS 카테고리 1로 분류한다. 이때 이를 확실히 검증하려면 보완적인 시험도 실시하는데 이는 시험자가 선택적으로 실시한다. 보완시험의 경우 두 번째 동물에 5 mg/kg을 투여하며, 이때 동물이 사망하면 GHS 카테고리 1 분류를 확정한다. 만약 생존할 경우 추가로 1 마리씩 일정한 시간 간격(앞서 투여한 동물의 생존이 확인된 후)을 두고 총 3 마리를 5 mg/kg 용량으로 투여한다. 이때 2 마리 이상 사망할 경우 GHS 카테고리 1로 분류하며, 1 마리 이하 사망 시 카테고리 2로 분류한다(그림 1 참조).

2.3.5. 동물복지를 위하여 5,000 mg/kg 고정용량시험은 권장되고 있지 않으나 필요하다고 판단될 때는 특별히 5,000 mg/kg 고정용량 시험을 수행할 수 있는데 이때에는 걱정 사유를 언급하여야 한다.

2.4. 본시험

2.4.1. 각 시험용량에 대해 한쪽 성(암컷을 원칙으로 함) 5 마리를 시험동물로 사용한다. 이때 예비시험에 사용된 동물 1 마리를 5 마리에 포함시켜 결과를 산출하도록 한다(예비투여에서의 투여 용량이 본시험과 다른 경우는 제외).

2.4.2. 예비시험의 결과를 토대로 설정한 용량을 시험동물에 투여하며 이때 나타난 독성반응에 따라 카테고리를 분류한다.

2.4.3. 관찰기간은 보통 14 일정도 실시하는데 관찰기간은 고정적이지는 않으며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.

2.4.4. 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 한번 관찰하고, 24 시간 마다 주기적으로 관찰을 실시한다. 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다.

2.4.5. 관찰기간 동안 시험물질의 용량별 투여 주기는 독성증상에 따라 시험자가 선택할 수 있으나 보통 3 일 ~ 4 일 주기의 투여를 권장 한다.

2.4.6. 한계시험은 시험물질이 무독성일 가능성이 있을 때 수행될 수 있다. 2,000 mg/kg(특별한 경우 5,000 mg/kg)으로 시작되는 예비시험을 거친 후 동일 용량으로 추가 4 마리에 대해서 본 시험의 절차에 따라 수행한다(그림 2 참조).

2.4.7. 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록이 되도록 해야 한다.

2.4.8. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.

2.4.9. 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전 측정하며, 시험기간 중에는 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다. 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 기록한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 부식성이나 자극성이 큰 물질의 경우 시험동물에 고통을 주므로 되도록 시험을 피하도록 한다.

2.5.2. 예비시험에서 가능한 5 마리 이상의 시험동물은 사용하지 않도록 한다.

2.5.3. 시험동물이 참기 힘들 정도로 고통스러워 할 경우 안락사 시키며 시험 중 사망한 동물로 처리한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험동물

종, 동물의 수, 연령, 공급원, 사육조건, 각 개체의 사육 조건

2.4. 시험물질

물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험 물질의 안정성

2.5. 시험용매명 및 선정사유

2.6. 시험조건

시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

2.7. 시험결과

(1) 성별

(2) 용량별 독성반응 결과

(3) 사용동물 수, 체중변화, 사망 및 부검동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부 및 털, 눈 및 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계, 행동유형, 독성증상 정도

(4) 용량별 독성반응 결과

사용 동물수, 체중변화, 사망 및 부검 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계에 나타나는 독성증상(행동유형, 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등)

(5) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

(6) 부검기준 및 근거

(7) 부검 결과

(8) 결과의 해석

그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (1)

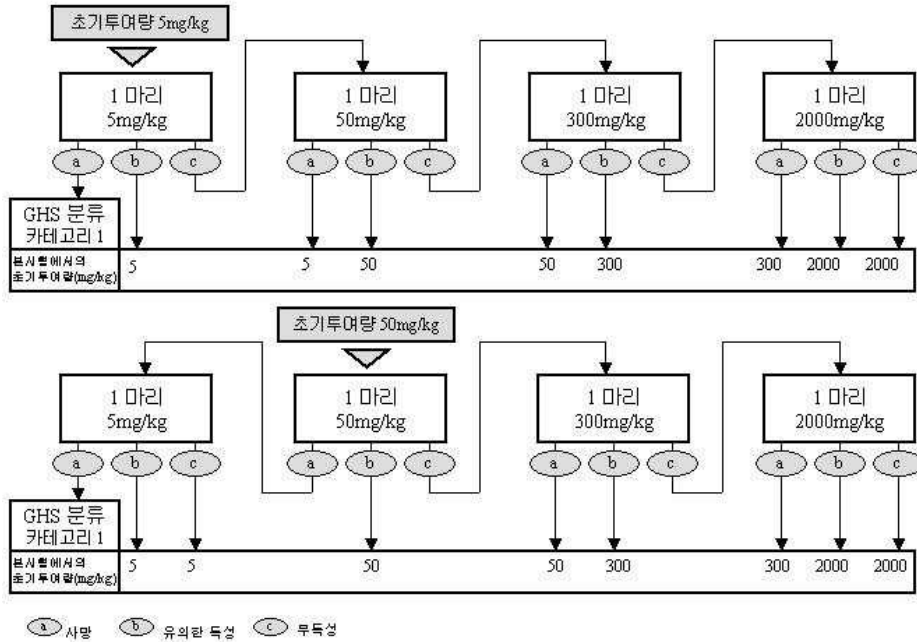


그림 1. 예비시험 단계의 흐름도 (2)

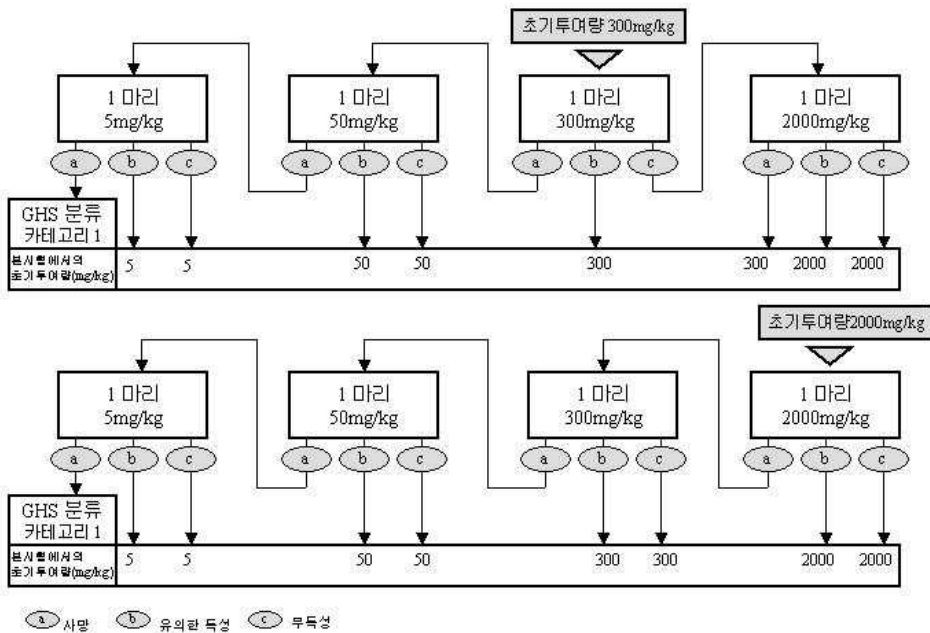


그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (1)

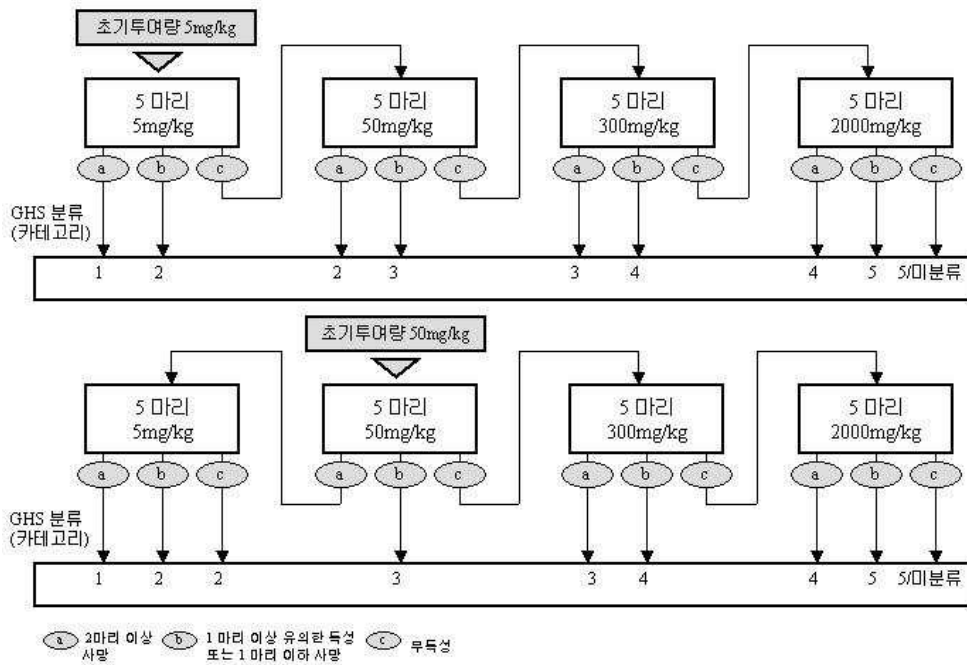
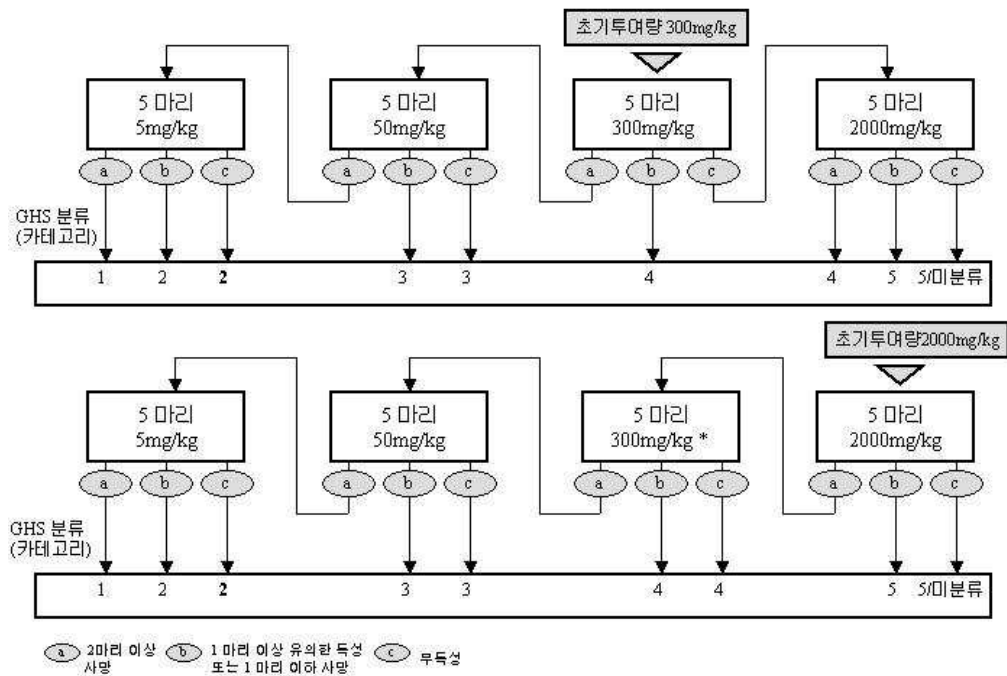


그림 2. 본시험 단계의 흐름도 (2)



제16항 생식 및 발달(발생)독성 스크리닝시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 생식 및 발생에 미치는 시험물질의 영향에 대한 초기 정보를 확보하는데 그 목적이 있으며 생식/발생 독성시험의 용량을 결정하기 위한 스크리닝 시험이다.

2. 정의

2.1 생식독성(reproduction toxicity)

차세대에 대한 유해한 영향 및(또는) 암·수의 생식 기능 장애 혹은 능력 장애

2.2 모체독성(maternal toxicity)

직접 혹은 간접적으로 나타나는 수태한 암컷에 대한 부작용

2.3 번식능 장애(impairment of fertility)

수컷 혹은 암컷의 생식 기능 혹은 능력 장애

2.4 발생독성(developmental toxicity)

차산자의 출생 전, 주산기 그리고 출생 후에 관찰되는 구조적 혹은 기능적 장애를 나타내는 생식 독성의 징후

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

시험에 사용되지 않은 건강하고 임신 경험이 없는 랫드를 사용한다. 시험에 사용되는 동물들의 체중 차는 최소로 하고, 동물 개체의 체중과 각 성별의 평균 체중과의 차는 $\pm 20\%$ 이하로 한다. 시험물질 투여 전 성주기(oestrous cycle)를 평가한다.

1.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 사육밀도는 각 개체의 관찰이 용이하도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 사료와 음용수를 자유롭게 섭취하도록 한다. 수태한 암컷은 한 마리씩 케이지에 두고, 깔짚을 공급해야 한다. 그 밖의 동물실 환경조건은 일반적인 환경기준치에 따른다.

1.3 시험물질

시험물질의 최대 1 회 경구 투여량은 수용액의 경우 2 mL/100 g(체중), 비수용액의 경우 1 mL/100 g(체중)을 초과하지 않아야 한다. 사료 혹은 음용수를 통해 투여되는 경우 동물의 체중 당 일정한 투여량을 적용한다.

1.4 시험군의 구성 및 투여농도 설정

- (1) 최소 3 개의 투여군과 1 개의 대조군으로 각 군 당 수컷 10 마리 및 암컷 12 마리 ~ 13 마리(수태한 암컷의 최소수는 10 마리)로 구성한다.
- (2) 급성 독성시험 혹은 반복 투여독성시험 결과에 근거하여 투여용량을 결정한다. 시험물질 또는 관련 물질에 관한 모든 독성 및 역학 자료를 고려한 후 투여용량을 선택한다. 독성 영향은 유발하지만 죽거나 심한 고통은 주지 않는 최대용량을 선택하여야 한다. 최대용량 선정 후, 2 배 ~ 4 배의 공비로 투여용량을 줄이는 것이 이상적이다. 용량간격이 대단히 큰 경우(즉, 공비가 10 이상), 최저용량 시험군을 하나 더 둔다. 시험물질을 투여할 때 용매를 사용하는 경우, 사용된 최대용량의 용매를 대조군에게 투여한다.
- (3) 1 회 경구 투여농도가 최소 1,000 mg/kg/day이거나 동일한 양의 시험물질을 사료 혹은 음용수에 첨가·투여하여 어떠한 독성 영향도 발견할 수 없거나, 구조적으로 관련 있는 화합물에서 얻은 자료에 근거해 독성이 발견되지 않는 경우에는 한계시험을 진행할 수 있다.
- (4) 일반적인 독성(체중 감소, 신장, 간, 심장, 폐 등에의 영향) 혹은 변화(사료 섭취 감소, 간 비대 등)가 나타나는 경우, 내분비계 장애에 대한 해석에 주의한다.

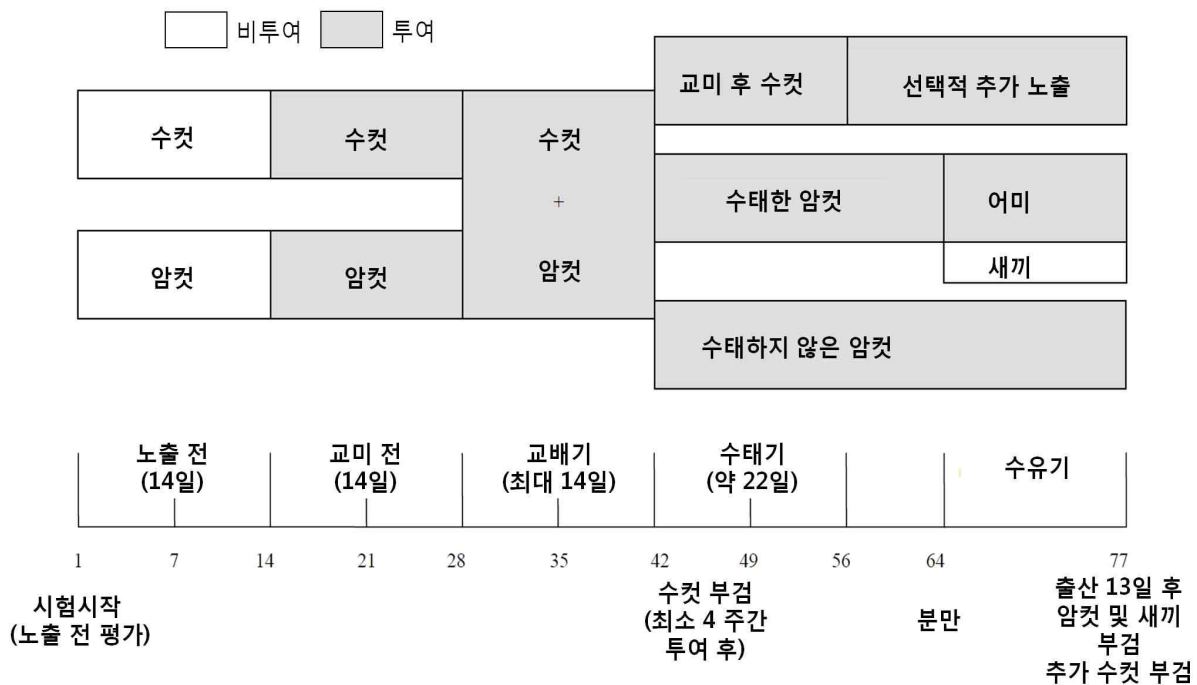
2. 시험방법

2.1 원리

여러 용량의 시험물질을 암컷 및 수컷에 투여한다. 수컷은 교미 전 최소한 2 주, 교미 기간, 교미 후 약 2 주 동안 투여하고, 암컷은 교미 전 2 주, 수태 시기, 수태 기간, 분만 후 적어도 13 일 이상, 부검 전 날을 포함하여 전 시험기간 동안 단계적 용량의 시험물질을 각 군에 투여한다. 이 시험을 통해 수태부터 출산 후 13 일까지, 차산자의 성장 및 발생, 수태능, 번식능, 모체 및 수유 행동에 대해 예상되는 시험물질의 영향을 관찰한다.

2.2 교미 및 시험물질 투여

- (1) 위관투여법을 사용하여 경구 투여한다. 사료 혹은 음용수를 통해 시험물질을 투여할 수도 있다. 위관투여법으로 투여되는 물질은 매일 같은 시간대에 투여해야 하고, 동물의 체중 당 일정한 양으로 투여하기 위해 적어도 1 주일에 한 번은 각 시험동물의 체중을 측정하여야 한다.
- (2) 최소 5 일 동안 순화 후, 교미 2 주 전부터 수컷과 암컷에게 시험물질을 투여한다. 투여 시기는 시험동물의 성 성숙이 완료되는 시점으로 SD 랫드의 경우 10 주령, Wistar 랫드의 경우 12 주령이 적당하다.
- (3) 교배기, 교미 후 28 일 동안 그리고 분만 후 수유기에도 투여를 계속한다. 교미는 일반적으로 암수 1:1로 진행하고 정자 혹은 질전(vaginal plug)이 관찰되면 수태 '0' 일로 정의한다. 출산일은 '분만 후 0 일'로 정의한다.



2.3 한배새끼 수(litter size)

- (1) 사용된 랫드 계통에서의 정상 한배새끼 수에 따라, 대개 한배에 성별 당 4 마리 ~ 5 마리의 새끼를 생후 4 일째에 무작위로 선택하고, 그 외의 새끼들은 제외하여 각 배에서 나온 새끼 수를 조정한다.
- (2) 2 마리의 여분 새끼에서 채혈하고 혈액을 합한 후, 혈청 갑상선호르몬(T4)을 측정한다. 체중 혹은 항문-성기 간 거리(AGD, anogenital distance) 등에 근거하여 선별적으로 새끼를 제외하는 것은 적합하지 않다. 수컷 또는 암컷 새끼의 수가 한배에 각 성별 당 4 마리 ~ 5 마리가 되지 않는 경우에 부분적인 조정이 허용된다.
- (3) 여분의 새끼가 1 마리만 확보된다면, 1 마리에서 채혈하여 혈청 중 T4를 측정한다. 한배새끼 수가 기준(8 마리 혹은 10 마리/배)보다 낮으면 새끼들을 제외하기 어려운 경우도 있다.
- (4) 만약 한배새끼 수를 조정하지 못했다면, 생후 4 일째에 한 배당 2 마리의 새끼에서 채혈하여 혈청 T4 농도를 측정한다.

2.4 일반증상관찰

시험기간 동안, 적어도 하루에 1 회 가능한 동일 시간대에 일반증상을 관찰하고,

독성 징후가 관찰됐을 때는 더 자주 관찰해야 한다. 행동 변화, 분만이 어렵거나 지연되는 징후, 폐사를 포함한 모든 독성 징후에 대해 발생 시간 및 기간을 기록한다.

2.4.1 체중 및 사료/음용수 섭취량

- (1) 투여 첫날, 수컷과 암컷의 체중을 측정한 후, 시험이 끝날 때까지, 적어도 1 주일에 1 회 체중을 측정한다. 수태 0 일, 7 일, 14 일, 20 일 후와, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 내에 그리고 분만 후 4 일 및 13 일에 암컷의 체중을 측정한다.
- (2) 사료 섭취량은 교미 후, 수태 기간, 수유 기간 동안 적어도 1 주일에 1회 측정하고 시험물질이 음용수를 통해 투여되는 경우 이 기간 동안 음용수 섭취량도 측정해야 한다.

2.4.2 성주기

시험물질 투여 전에 성주기를 측정하여, 정상 주기를 나타내는 암컷을 시험에 사용한다.

2.4.3 차산자 관찰

임신 0 일부터 계산된 수태기간을 계산하고, 분만 후 24 시간(분만 후 0 일 혹은 1 일) 및 분만 4 일 및 13 일 후 생존한 차산자, 사망한 차산자, 작은 차산자 수 및 성별을 조사하고 체중 및 어미와 차산자 모두 이상행동을 기록한다. 생후 0 일 ~ 4 일 중 동일한 날에 차산자에서의 항문-성기 간 거리(AGD)를 측정하고, 체중을 동시에 측정하여 체중으로 보정한다. 수컷 유두(유륜) 수는 대개 생후 12 일 또는 13 일에 계수한다.

2.4.4 생화학적 검사

다음과 같이 채혈을 수행한다.

- 생후 4 일째, 한배 당 적어도 2 마리의 차산자
- 분만 후 13 일째 시험종료 시, 모든 어미와 한배 당 적어도 2 마리의 차산자
- 시험 종료 시, 모든 수컷

수컷 성체와 생후 13 일째의 차산자에게서 얻어진 혈액에서 갑상선호르몬(T4)을 측정한다. 가능하면 생후 4 일 및 어미에서의 갑상선호르몬도 평가한다. 호르몬 측정을 위한 혈장 샘플은 비슷한 시간대에 확보한다. 호르몬 농도를 분석 할 때 얻은 수치는 분석 키트에 따라 다를 수 있다. 안락사 시간, 방식, 키트 종류에 따라 호르몬 측정의 가변성과 절대 농도에 영향을 줄 수 있다. T4와 TSH를 측정한 경우 총갑상선 호르몬으로 표시한다.

2.4.3 병리학적 관찰

고농도 시험군과 대조군 동물의 난소, 고환, 부고환에 대해 상세한 조직병리학 검사를 실시하고 필요하면 다른 투여 시험군 또는 다른 장기도 조사한다. 생후 13 일째의 새끼들은 전반적인 이상을 평가하고, 외부 생식기관, 난소, 고환 및 보조 생식기관, 갑상선 등을 관찰한다. 갑상선 중량은 고정 후 실시한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험자료의 처리

통계 분석을 사용하는 경우, 이 통계 분석은 조사된 변수 분포에 적합해야 하고, 시험을 시작하기 전에 선택해야 한다. 시험군의 크기가 작기 때문에, 시험을 이해하는데 도움을 받기 위해, 잘 알려진 대조군 자료(즉, 한배새끼 수)를 사용하면 유용하다. AGD 및 유두(유륜) 수(nipple retention)를 통계적으로 분석한다.

2. 시험결과에의 평가

시험물질 투여군과 대조군과의 관계, 전체적 이상 영향, 확인된 표적기관, 불임, 일반증상관찰, 생식 및 수태 능력, 체중 변화, 폐사 영향 등 기타 모든 독성 영향이 평가에 포함된다. 생식/발생 독성을 평가하기 위해, 한배새끼 수, AGD, 유두(유륜) 수, 갑상선호르몬 수치 등을 대조군과 비교한다. 수컷에 대한 투여 기간이 짧기 때문에 수컷의 생식에 대한 영향을 평가하는 경우, 번식능 자료와 함께 고환과 부고환의 조직병리학적 결과를 반영한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 및 대조물질 정보

- (1) IUPAC 또는 CAS 번호와 같은 화학물질 명
- (2) 시험물질의 순도 또는 실험용 혼합물질(무게 %로 나타냄)의 배합, 물리적 특성 및 순도
- (3) 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용해도, 물리화학적 성질
- (4) 물이 아닌 용매를 사용하였을 때, 선택 이유에 대한 적정성

3.4 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 사육조건, 시험 시작 시 각 동물의 체중

3.5 시험 조건

- (1) 투여 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 조제와 사료의 조제 내용(시험물질을 사료를 통해 투여할 경우), 달성된 농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질 투여 내역에 대한 세부 사항
- (4) 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)를 실제 투여량(mg/kg/day)으로 전환
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

3.6 시험 결과

- (1) 체중, 사료 및 음용수 섭취량
- (2) 번식능, 수태, 기타 모든 독성 징후를 포함한 성 및 투여별 독성 반응 자료

- (3) 수태 기간
- (4) 생식, 차산자, 출생 후 성장 등에 대한 독성 혹은 다른 영향
- (5) 일반증상관찰의 특성, 심각성, 기간
- (6) 생존한 차산자 및 착상 후 죽은 태자 수
- (7) 전체적인 이상을 가진 차산자 수, 작은 차산자 수
- (8) 차산자 체중
- (9) 모든 차산자에서의 AGD
- (10) 수컷 차산자에서의 유두(유륜) 수
- (11) 생후 13 일째 차산자 및 수컷 성체에서의 갑상선호르몬(측정되었다면 암컷 및 생후 4 일째 차산자에서의 자료도 포함)
- (12) 시험 기간 동안 시험동물이 폐사한 시기 혹은 생존한 동물의 부검시기
- (13) 착상한 태자 수, 황체의 수(권장사항), 한배새끼 수 및 체중
- (14) 부검 동물의 체중 및 수태한 동물의 장기 무게
- (15) 부검 결과
- (16) 수컷 생식 기관 및 다른 조직에 대한 현미경 관찰 결과
- (17) 결과에 대한 적절한 통계 방법
- (18) 표의 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서
- (19) 무영향관찰용량(NOAEL)

3.7 결과에 대한 고찰 및 결론

표. 생식/발생독성 스크리닝 시험 요약보고서

일반증상관찰 투여용량(단위)	값				
	0(대조군)
짜짓기 시작(N)					
성주기					
교미 증거를 보여주는 암컷(N)					
수태에 성공한 암컷(N)					
수태 1 일 ~ 5 일(N)					
수태 6 일~... ⁽¹⁾ (N)					
수태 ≤ 21 일(N)					
수태 = 22 일(N)					
수태 ≥ 23 일(N)					
건강하게 출산한 어미(N)					
출산 후 4 일(pp)이 된 어미(N)					
황체/어미(평균)					
착상/어미(평균)					
생존한 차산자/출산한 어미(평균)					
생존한 차산자/출산 4 일 후 어미(평균)					
출생한 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)					
출생 4 일 후 차산자의 성 비율(수컷/암컷)(평균)					
출생한 한배새끼의 출생 당시 평균 체중					
출생 4 일 후 한배새끼의 평균 체중					
출생한 차산자의 4 일 후 평균 체중					
출생한 차산자의 출생 당시 평균체중					
AGD 측정 시 차산자 체중(암컷 및 수컷 평균)					
출생 4 일 후 차산자 AGD(암컷 및 수컷 평균)					
출생 13 일 후 수컷 차산자의 유두(유륜) 수(평균)					
출생한 차산자의 13 일 후 평균 체중					
비정상적인 차산자					
‘0’ 인 어미					
‘1’ 인 어미					
‘≥ 2’ 인 어미					
죽은 차산자					
착상 전(황체 - 착상)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘≥ 3’ 인 암컷					
출생 전/착상 후(착상 - 생존한 차산자)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘≥ 3’ 인 암컷					
출생 후(생존한 차산자 - 출생 13 일 후 생존한 차산자)					
‘0’ 인 암컷					
‘1’ 인 암컷					
‘2’ 인 암컷					
‘≥ 3’ 인 암컷					

⁽¹⁾ 교미 기간 마지막 날

제17항 급성 경구독성시험(독성등급법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험동물의 보호를 위해 시험물질에 의한 사망 또는 고통을 가급적 줄이고자 최소한의 동물에 시험물질을 경구 투여하여 급성독성 증상을 관찰하는데 목적을 둔다.

2. 정의

2.1. 급성 경구독성

시험물질을 (24 시간 이내에) 1 회 또는 수회 경구투여한 후 단시간 내에 나타나는 유해영향(Adverse effects)

2.2. 투여량(Dose)

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게(체중) 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.3. 빈사 상태(Moribund state)

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.4. 지연 사망(Delayed death)

시험물질 투여 후 48 시간 이내에 사망 또는 빈사상태에 도달하지는 않으나 투여 후 14 일간의 관찰기간 동안 사망하는 경우

2.5. GHS(Globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 공인되고 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템

2.6. 사망 임박(Impending death)

다음 관찰 시기 전 사망 또는 빈사상태가 예견되는 상태로서 경련을 일으키거나 옆으로 누워있는 상태가 관찰되는 상황

2.7. 예측 사망(Predictable death)

시험이 종료되기 전 사망을 예측 가능하도록 임상학적인 징후를 보이는 상태(예, 물이나 먹이에 접근하지 못하거나, 물이나 먹이를 먹지 못하는 상태)

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

시험이 시작되는 시점에 연령이 8 주령 ~ 12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다. 암컷은 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않는 개체를 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다. 각 동물의 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 한다.

1.2. 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암·수를 구별하여 실시하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하도록 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12 시간/12 시간이 되도록 조절하며, 먹이와 물을 적절히 공급한다.

1.3. 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용성 액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, 옥수수기름) 또는 기타 다른 용매를 사용한다. 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

2. 시험방법

2.1. 원리

한계시험 또는 본시험에서는 단일 성(가능한 압컷을 우선으로 함)의 동물을 사용하여 제시된 용량에 대해 단계적으로 시험한다. 시작 용량은 기존의 독성자료에 근거하여 선정하는데 사망동물이 관찰될 수 있을 것으로 예측되는 용량으로 한다. 시작 용량의 경과에 따라 다음 용량을 결정한 후 단계적으로 투여한다.

2.2. 시험물질의 투여

2.2.1. 경구 투여하는 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g까지 허용한다.

2.2.2. 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시한다. 이때 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.

2.2.3. 시험물질을 투여하기 전날 저녁부터 물을 제외한 먹이 공급을 중단하고 체중을 측정한다(마우스의 경우는 투여 전 3 시간 ~ 4 시간 전부터 먹이 공급을 중단한다). 절식후의 체중을 기준으로 시험물질을 경구투여한다. 시험물질의 경구투여 후 3 시간 ~ 4 시간 후(마우스의 경우는 1 시간 ~ 2 시간 후)부터 먹이를 공급한다. 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 물과 먹이를 적절히 제공한다.

2.3. 한계시험(limit test)

2.3.1. 한계시험은 해당 시험물질 또는 시험물질과 유사한 특성을 지닌 물질의 독성이 비교적 낮거나 독성이 없다고 예상되는 경우에만 수행한다.

2.3.2. 한계시험은 한 가지 농도인 2,000 mg/kg(체중)을 투여한다. 시험물질의 투여는 6 마리를 대상으로 하는데 3 마리씩 2 단계로 수행한다. 1 단계에서 투여한 3 마리에서 관찰되는 사망(또는 빈사상태) 정도에 따라 다음 단계로 넘어간다. 사망

(또는 빈사상태) 개체수가 0 마리 ~ 1 마리의 경우는 2 단계에서 3 마리에 대해 동일농도(2,000 mg/kg)를 재차 투여하며, 이때 0 마리 ~ 1 마리가 사망(또는 빈사상태)하는 경우, 시험물질을 GHS 카테고리(Category) 5로 등급을 분류한다. 한편 1 단계 또는 2 단계에서 사망(또는 빈사상태) 개체수가 2 마리 ~ 3 마리로 발생하는 경우, 이보다 저농도(300 mg/kg)에서 시험을 수행한다(그림 1 참조).

2.3.3. 시험물질의 독성이 없다고 예상되거나 관련 정보 및 걱정 사유가 있는 경우, 한계시험을 5,000 mg/kg에서 수행할 수도 있다. 이때 1 마리에 먼저 투여했을 때 바로 사망하면 2,000 mg/kg부터 다시 시험을 수행한다. 반면, 사망하지 않는 경우 순차적으로 2 마리에 계속 투여했을 때 모두 사망하지 않는 경우(3 마리 모두 사망하지 않는 경우)는 미분류(unclassified) 등급으로 구분하며, 1 마리가 사망하는 경우 LD₅₀이 5,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하고, 2 마리 모두 사망할 경우 2,000 mg/kg 농도에서 시험을 수행한다(그림 1 참조).

2.3.4. 한계시험의 관찰기간 및 방법은 본 시험에서와 동일하게 한다.

2.4. 본시험

2.4.1. 각 시험용량에 대해 단일 성(암컷을 우선으로 함)인 3 마리를 시험동물로 사용한다.

2.4.2. 시험 시작은 제시된 용량(5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2,000 mg/kg) 가운데서 독성 증상(사망 또는 빈사상태)이 나타날 것으로 예측되는 용량 하나를 선택하여 3 마리씩 투여하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 농도에서 시험을 계속 진행한다(그림 1 ~ 4 참조). 상기 4 가지 고정된 용량 가운데 2,000 mg/kg에서 시험을 시작하는 경우는 이를 한계시험이라 할 수 있다.

2.4.3. 시험물질 또는 이와 유사한 물질의 독성정보가 없는 경우, 300 mg/kg 용량으로 시험을 시작한다.

2.4.4. 관찰기간은 일반적으로 14 일 실시하는데 관찰기간은 고정적이지는 않으며 독성반응, 속도, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.

2.4.5. 관찰은 투여 후 30 분 이내에 적어도 한번 관찰하고, 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다. 이후 14 일까지 적어도 매일 1 회 이상 관찰한다.

2.4.6. 시험물질의 투여 후 시험동물의 증상(사망 또는 빈사상태)이 명확히 관찰된 경우, 다음 시험단계로 진행한다. 빈사 상태의 동물은 안락사 시킨다.

2.4.7. 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록하여야 한다.

2.4.8. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.

2.4.9. 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전 측정하며, 시험기간 중에는 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다. 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 기록한다. 필요시 부검 후 조직병리학적 관찰을 통한 소견을 기록한다.

2.5. 시험상의 유의사항

2.5.1. 부식성이나 자극성이 큰 물질의 경우 시험동물에 고통을 주므로 되도록 시험을 피하도록 한다.

2.5.2. 시작농도 선택에 신중을 기함으로써 시험동물의 수를 가능한 최소화 하여야 한다.

2.5.3. 시험동물이 참기 힘들 정도로 고통스러워할 경우 안락사 시키며 시험 중 사망한 동물로 처리한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험용량, 시험동물 수, 독성증상을 보이는 시험동물 수, 시험기간 중 치사동물 수, 독성발현 및 시간, 용량-독성반응 관계, 부검결과 등을 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험동물

종, 시험동물의 수, 성별, 연령, 공급원, 먹이 종류, 각 개체의 사육 조건

2.4. 시험물질

물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험 물질의 안정성, 기타 정보

2.5. 시험용매명 및 선정사유

2.6. 시험조건

시험기간, 투여용량 수준 및 횟수, 먹이공급 시기

2.7. 시험결과

(1) 성별

(2) 용량별 독성반응 결과

(3) 사용동물 수, 체중변화, 사망 및 빈사 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부 및 털, 눈 및 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계, 행동유형, 독성증상 정도

(4) 용량별 독성반응 결과

사용 동물수, 체중변화, 사망 및 부검 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 피부, 털, 눈, 점막, 소화계, 호흡계, 순환계, 중추신경계에 나타나는 독성증상(행동유형, 경련, 설사, 유연, 혼수상태 등)

(5) 독성증상을 보이는 시간 및 회복 시간

그림 3. 본시험 단계의 흐름도

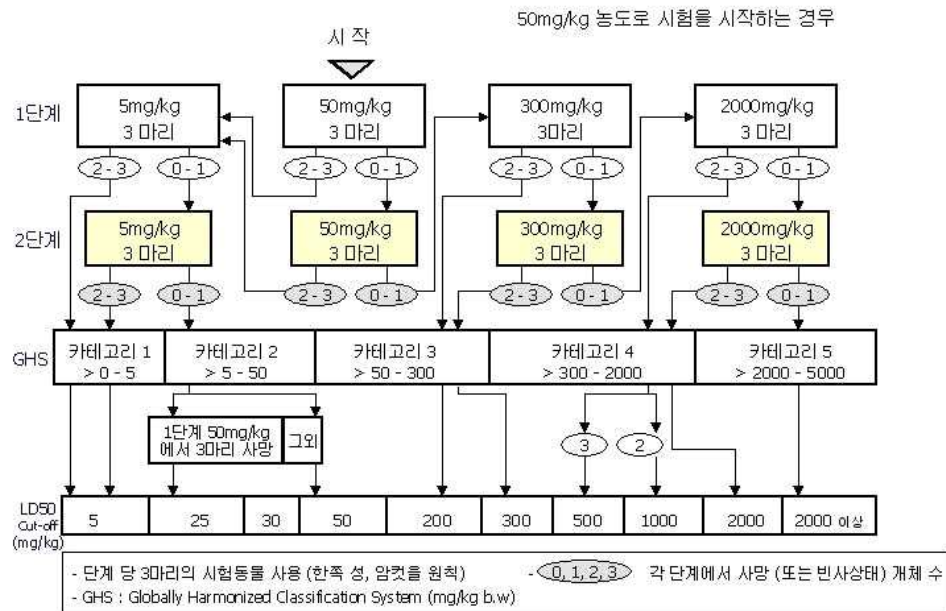
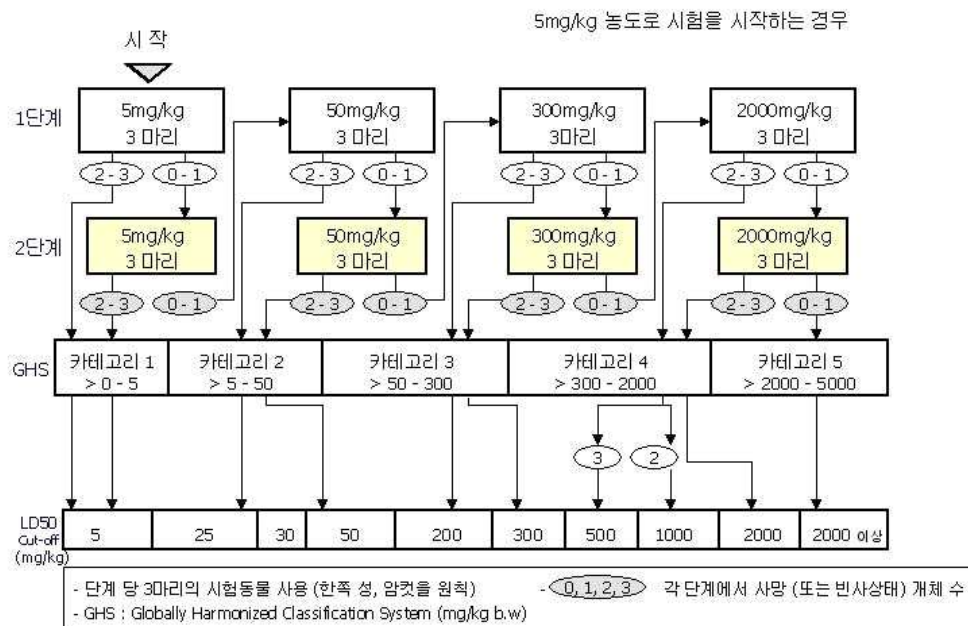


그림 4. 본시험 단계의 흐름도



제18항 설치류 신경독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 성숙한 설치류에 시험물질을 투여한 후 일반증상관찰, 기능검사, 행동학적 영향 및 병리학적 영향 등을 평가함으로써 화학물질의 신경독성 가능성을 확인하는 데 그 목적이 있다.

II. 시험

1. 원리

시험물질을 대조군과 처리군에 경구로 반복투여한 후 일반증상 관찰, 기능검사, 행동학적 이상 반응 및 신경학적 이상반응을 평가한다. 투여 기간은 단회, 28 일, 90 일 또는 1 년간으로 시험목적에 따라 달리할 수 있다. 시험 중반에, 각 동물군의 암·수 일부에 대해 뇌, 척수 및 말초신경에 대한 조직병리학적 검사를 실시한다. 경구반복투여 독성시험과 병합하여 진행할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

본 시험에 사용하는 설치류는 랫드를 사용하는 것이 가장 적절하다. 다른 종을 사용할 경우에는 적절한 논리적 근거를 제시한다. 랫드는 가능한 6 주령 전에 투여를 시작하는 것이 좋으며 시험 시작 시에 각 성별로 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하는 개체는 사용하지 않는 것이 좋다. 암컷은 출산의 경험이 없고 임신하지 않은 동물이라야 한다.

2.2 사육조건

- (1) 사육실의 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\% \sim 60\%$ 가 되도록 유지하고 조명은 인공적으로 조절하며 명암주기는 12 시간 간격으로 설정한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

- (2) 동물은 시험시작 최소 5 일 전에 실험실 조건에 순화시키며 개별적으로 케이지에 유지하거나 같은 성별로 구분하여 소규모 군으로 케이지에 사육한다. 케이지의 공간 배치로 인해 동물이 영향을 받지 않도록 한다.

2.3 투여경로의 결정 및 시험물질의 조제

- (1) 투여경로는 사람의 노출경로와 가장 유사한 경로를 선정한다. 본 시험법은 경구투여를 원칙으로 설계되었으며, 흡입이나 경피노출의 경우에는 본 시험법을 적절히 보완하여 사용할 수 있다.
- (2) 시험물질은 물에 녹여 사용하는 것이 가장 적절하며 물에 녹지 않을 경우 옥수수 오일 등 오일류를 사용한다. 용매가 시험물질에 미치는 영향뿐만 아니라 사료나 음용수의 섭취량에 미치는 영향 등에 대해서도 사전에 고려하여야 한다.

3. 시험방법

3.1 동물의 수, 성별, 시험군과 대조군

- (1) 신경독성시험을 단독으로 실시하거나 경구반복투여시험과 병합하여 실시할 수 있으며 이때 각 시험군과 대조군은 신경독성 평가에 필요한 충분한 수의 동물을 사용하도록 한다. 단독 시험의 경우 각 군마다 암수 각각 10 마리씩 최소 20 마리를 사용하며 이 가운데 최소 암·수 각각 5 마리는 신경조직병리 검사에 사용한다. 각 군별 최소한의 동물 수에 대한 기준은 별표 1에 제시되어 있다.
- (2) 중간부검군, 회복군, 지연반응군, 보조군에 대한 실험계획이 있다면 이 경우에도 시험물질의 영향을 관찰하는 데에 충분한 수의 동물을 배정하도록 한다.
- (3) 동물군은 최소 3 개 용량군의 시험군과 대조군을 둔다. 시험물질 처리 시에 용매를 사용한 경우 대조군에도 동일한 방법으로 용매를 처리하며 최고 부피를 투여한다.

3.2 한계시험

구조-활성 상관성 및 기존의 자료를 통해 1,000 mg/kg 용량에서 신경독성영향이 나타나지 않을 것으로 예측되는 경우에는 군이 3 개 용량을 모두 투여할 필요는 없다. 사람의 노출량을 근거로 한계시험의 최고용량을 정할 수 있으며 경구투여의 한계용량은 최소 2,000 mg/kg이어야 한다.

3.3 투여방법

3.3.1 용량선정

- (1) 용량선정은 기존의 독성시험 및 독성동태 자료를 고려하여야 한다. 최고용량에서는 평가를 대상으로 하는 신경독성의 종말점에서 반응이 나타나는 용량 또는 전신독성이 명확히 나타나는 용량을 선정하여야 한다.
- (2) 최고용량을 결정한 이후에는 저용량단계를 결정하며 용량-반응성과 무영향관찰용량(NOAEL)을 제시할 수 있도록 설계한다. 공비는 2 또는 3을 적용하는 것이 적정하며 경우에 따라서는 공비 10을 적용한 4 번째 시험군을 추가로 두기도 한다.

3.3.2 투여

- (1) 본 시험에서는 시험물질은 최소 28 일 동안 주 7 회 매일 투여하는 것을 원칙으로 한다. 주 5 회 또는 그 이하로 투여할 경우에는 타당한 근거를 제시하여야 한다.
- (2) 위관투여의 경우 1 일 1 회 투여를 원칙으로 하며 투여 부피는 실험동물의 크기에 따라 달리할 수 있으나 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않도록 한다. 수용액인 경우 체중 100 g 당 2 mL까지 투여할 수도 있다.
- (3) 위관투여를 하지 않고 시험물질을 물이나 사료에 첨가하여 투여하는 경우에는 이들이 실험동물의 정상적인 영양 균형 또는 체액 균형을 깨뜨리지 않도록 주의한다.

3.4 일반증상관찰

3.4.1 일반증상관찰 및 빈도

투여 후 실험동물의 일반증상관찰은 행동변화, 신경학적 이상반응을 평가하는데 최대한의 정보를 얻을 수 있는 충분한 빈도로 수행되어야 하며 관찰기간은 전체 투여기간 동안 이루어져야 한다. 시험물질 노출기간에 따른 관찰기간 및 횟수는 별표 2에 기술되어 있다. 관찰은 하루 중 같은 시간대에 수행하도록 한다.

3.4.1.1 일반 건강상태, 사망

모든 동물의 건강상태는 하루 최소 1 회 관찰하며, 사망여부는 최소 하루 2 회 이상 관찰한다.

3.4.1.2 일반증상관찰

- (1) 모든 개체에 대해 별표 1과 별표 2에 투여 전, 투여 및 관찰기간 동안과 정해진 횟수에 따라 상세한 일반증상관찰을 실시한다. 회복군은 회복기간의 마지막 날에 관찰한다. 시험물질에 의한 영향의 정도를 점수화하도록 한다.
- (2) 일반증상관찰은 피부, 털, 눈, 점막, 분비물의 발생 및 자율 신경계 활동(예: 눈물분비, 털세움, 동공 크기, 비정상적인 호흡 패턴 및/또는 구강 호흡, 배뇨이상 또는 배변이상의 징후, 뇨의 색깔 등) 등을 포함하며, 이들만으로 국한시켜 관찰하기 보다는 가능한 넓은 범위에서 관찰하도록 한다.
- (3) 신체의 자세, 활동수준(예: 정해진 구역에서의 움직임 증가 또는 감소) 및 운동조화능력 등에 대한 비정상적인 반응도 기록해야한다. 간대성 또는 긴장성 움직임, 경련, 떨림, 반복움직임(예: 과도하게 털을 핥는 행위, 비정상적인 머리 움직임, 반복적인 회전운동 등), 기괴한 행동(예: 물어뜯거나 과도한 핥기, 자기 절단, 뒤로 걷기, 발성) 또는 공격성뿐만 아니라 보행의 변화(예: 걷는 것을 매우 힘들어 함, 운동 실조 등), 자세(구부린 등), 손의 위치 반응, 또는 기타 환경변화 등도 관찰하고 기록한다.

3.4.1.3 기능 시험

- (1) 모든 개체에 대해 투여 전, 별표 1과 별표 2에 제시된 관찰기간 및 정해진 횟수에 따라 기능 시험을 실시한다. 회복군은 회복기간의 마지막 날에 실시한다.
- (2) 기능 검사는 서로 다른 형태의 감각기능의 자극에 대한 반응, 사지 악력, 운동활동 등을 평가한다.
- (3) 구조-활성 상관성, 역학조사결과, 기타 독성연구에서 신경독성의 가능성이 있다고 판단되는 경우에는 감각기능, 운동기능, 학습 및 기억 등에 관한 보다 전문적인 검사를 실시한다.

3.4.2 체중, 사료 및 음용수 섭취량

모든 동물에 대해 시험 전 체중을 측정하고 이후에는 주 당 최소 1 회 체중, 사료 및 음용수 섭취량을 측정한다. 90 일 이상 장기간 투여하는 경우 체중은 처음 13 주 까지는 주 당 최소 1 회, 그 이후에는 4 주 당 최소 1 회 이상 측정한다. 사료 및 음용수 섭취량의 경우 13 주 이전에는 주 당 최소 1 회, 그 이후에는 약 3 개월 마다 1 회 측정한다.

3.4.3 눈 검사

최고 용량군과 대조군에 대해 시험물질 투여 전과 투여 종료 후에 검안경을 사용하여 검안한다. 눈 검사에서 이상 징후가 발견될 경우 전체 동물에 대해 실시한다.

3.4.4 혈액학 및 혈청 생화학 검사

신경독성시험이 반복투여독성과 병합하여 수행되는 경우에는 혈액학 및 임상 생화학적 검사를 실시한다.

3.4.5 신경조직병리

- (1) 신경병리학적 조직검사는 *in vivo* 단계에서 관찰된 신경독성학적 조사결과를 보완하고 확장할 수 있도록 설계되어야 하며 최소한 각 군 당 암수 5 마리씩에 대해 실시한다. 파라핀 포매된 모든 조직에 대해 헤마톡실린 & 에오신 염색을 실시한 후 검경한다.
- (2) 조직검사를 수행해야하는 대표적인 중추신경 및 말초신경 부위는 전뇌, 대뇌, 중뇌, 소뇌, 뇌교, 연수, 시신경 및 망막을 포함한 눈, 척추, 배근신경절, 후근신경섬유, 배근섬유, 근위좌골신경, 근위경골신경 등이다. 척수 및 말초신경의 표본절편은 교차 또는 가로 및 세로 절편부위가 모두 포함하도록 한다. 신경망 구조에 대해 주의 깊게 살펴보아야 하며, 골격근 특히 종아리 근육 샘플이 검사되어야 한다.
- (3) 조직검사는 고용량부터 단계적 수준으로 하는 것이 바람직하며 고용량에서 특이적인 병변이 발생하지 않을 경우 더 이상의 분석은 수행하지 않아도 된다. 고용량에서 신경병리학적 이상이 발견될 경우에는 중용량, 저용량 순으로 검사를 진행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험자료

시험에 관련된 모든 개별 결과를 기록하며 가능한 표의 형태로 요약한다. 시험 결과는 발병률, 심각성, 신경행동학적 및 신경병리학적 영향과의 상관성 등의 관점에서 평가하며 수치화된 시험자료는 적절한 통계처리를 거쳐야 한다.

2. 시험보고서

시험보고서에는 다음 정보를 포함한다.

2.1 시험물질

- (1) 물리적 성질(이성체, 순도, 물리화학적 성질)
- (2) 식별 자료

2.2 용매

- (1) 용매 선택에 대한 논리적 근거

2.3 실험동물

- (1) 사용된 종 및 계통
- (2) 공급처, 사육조건, 순화, 사료 등
- (3) 동물의 수, 시작 시의 주령, 성별
- (4) 시험 시작 시 개체별 체중

2.4 시험조건

- (1) 시험물질에 대한 상세한 기술(제제, 사료 조제 내용, 농도, 안정성, 제제마다의 동질성)
- (2) 투여용량에 대한 상세내역, 용매, 용매의 부피, 투여된 제제의 물리적 형태
- (3) 시험물질 투여방법에 대한 사항
- (4) 용량선정에 대한 근거
- (5) 투여 경로 및 투여기간에 대한 근거
- (6) 사료/음용수 또는 흡입시험물질의 농도(ppm)에서 실제 노출용량(mg/kg/day)으로의 변환(해당되는 경우)
- (7) 사료 및 음용수에 관한 상세한 정보

2.5 일반증상관찰 및 시험절차

- (1) 실험동물을 각 군에 배당하는 방법
- (2) 상세 임상증상관찰, 관찰결과의 점수화 방법에 대한 상세한 설명(기준, 점수 크기 등)
- (3) 기능시험 진행에 관한 세부사항
- (4) 눈 검사 결과에 대한 세부사항
- (5) 신경행동, 신경병리, 신경화학, 신경전기생리 검사 등에 관한 시험절차

2.6 결과

- (1) 체중 및 체중 변화
- (2) 사료, 음용수 섭취량
- (3) 성별, 군별 독성반응 결과
- (4) 일반증상관찰 결과의 세부사항(증상의 정도, 발현시기, 지속시간, 회복여부 등)
- (5) 기능 시험결과
- (6) 부검소견, 눈 검사결과
- (7) 신경행동, 신경병리, 신경화학, 신경전기생리 등에 대한 검사 결과(있을 경우)
- (8) 흡수, 대사 시험자료(있을 경우)
- (9) 시험결과의 통계처리

2.7 결과 토의

- (1) 용량-반응에 관한 정보
- (2) 신경독성 결론에 대한 다른 독성 영향과의 상관관계
- (3) 무영향관찰용량(NOAEL)

별표 1. 신경독성시험에 필요한 랫드의 수(단독 또는 병합시험의 경우)

	단독시험	28 일 반복투여시험과 병합	90 일 반복투여시험과 병합	만성독성시험 과 병합
군 당 총 마릿 수	암컷 10, 수컷 10	암컷 10, 수컷 10	암컷 15, 수컷 15	암컷 25, 수컷 25
일반증상관찰 시 험을 포함한 기능 시험	암컷 10, 수컷 10	암컷 10, 수컷 10	암컷 10, 수컷 10	암컷 10, 수컷 10
신경조직병리시 험	암컷 5, 수컷 5	암컷 5, 수컷 5	암컷 5, 수컷 5	암컷 5, 수컷 5
혈액검사, 혈청 생화학검사, 조 직병리 등 반복 독성시험항목의 검사		암컷 5, 수컷 5	암컷 10, 수컷 10*	암컷 20, 수컷 20*
추가 시험 (필요한 경우)	암컷 5, 수컷 5			

* 일반증상관찰시험과 기능 시험 5 마리 포함

별표 2. 일반증상관찰 및 기능 시험의 횟수

관찰 형태		투여기간			
		급성	28 일	90 일	만성
모든 동물	일반 건강상 태	매일	매일	매일	매일
	사망률	하루 2 회	하루 2 회	하루 2 회	하루 2 회
기능관 찰 대상동 물	상세 일반증 상관찰	- 첫 투여 전 - 투여 후 8 시간 이내(최고영향발현 예측시점으로) - 투여 후 7 일과 14 일	- 첫 투여 전 - 이후 주 1 회	- 첫 투여 전 - 노출 1 주 및 2 주에는 1 회 - 그 이후 월 1 회	- 첫 투여 전 - 노출 첫 달 말 1 회 - 이후 3 개월 마다
	기능 시험	- 첫 투여 전 - 투여 후 8 시간 이내 (최고영향발현 예측시 점으로) - 투여 후 7 일 14 일	- 첫 투여 전 - 4 주째, 가능 한 투여 종료일 임박하여	- 첫 투여 전 - 투여 1 주 또는 2 주 중 1 회 - 그 이후 매일	- 첫 투여 전 - 노출 첫 달 말 1 회 - 그 이후 3 개월 마다

제19항 생체외 피부 부식성시험(피부 전기저항성시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 살아있는 동물이 아닌 생체외(*In vitro*)에서 피부 부식성에 대한 시험을 통해 부식성이 있는 화학물질 또는 혼합물의 특성을 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 생체내(*In vivo*) 피부 부식성(Skin corrosion *in vivo*)

피부에서의 회복 불가능한 손상 유발. 부식성 반응은 표피에서 진피까지 육안으로 관찰 가능한 조직 괴사가 일어나는 경우로서, 시험물질을 4 시간까지 처리했을 때는 궤양, 출혈, 혈액딱지가 형성되며 14 일 이후에는 피부 표백, 탈모 및 상흔이 유발 되는 것. 단, 확실하지 않은 손상에 대해서는 조직병리학적 검사 필요

2.2. 피부 전기저항성(TER, Transcutaneous Electrical Resistance)

피부에서의 전기적 저항 수치. 단위는 $k\Omega$ 으로 나타내며, 전기저항 측정(Wheatstone bridge) 장비를 이용하여 피부의 이온 투과성을 기록함으로써 피부의 장벽 기능을 평가하는 방법

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1. 시험동물

1.1.1. 동물종의 선택

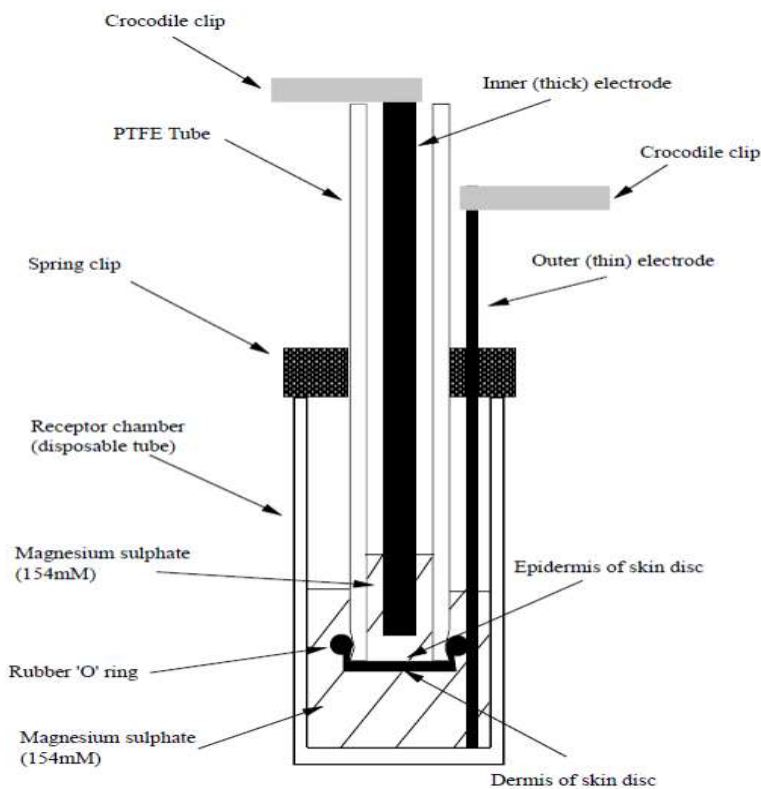
화학물질의 부식성에 대해 적절한 감도를 가진 랫드를 사용한다. 시험동물은 성체 모근에서 털이 자라나기 시작하기 전, 모낭이 활성화되기 이전의 연령 및 종을 사용한다.

1.1.2. 동물 성별 및 시험 전 준비사항

소형 이발기를 이용해 약 22 일령 수컷 또는 암컷 랫드(Wistar 또는 유사종)의 등 부위와 측면의 털을 깎는다. 동물을 조심스럽게 닦고, 털을 깎은 부분은 항생제 용액(예, 미생물 생장을 억제하기 위한 적절한 농도의 Streptomycin, Penicillin, Chloramphenicol 및 Amphotericin 등을 함유한 용액)으로 소독한다. 그 후 3 일 ~ 4 일이 경과되면 항생제를 다시 처리한 후 3 일이 지나기 전에 실험에 사용한다.

1.2. 시험장치

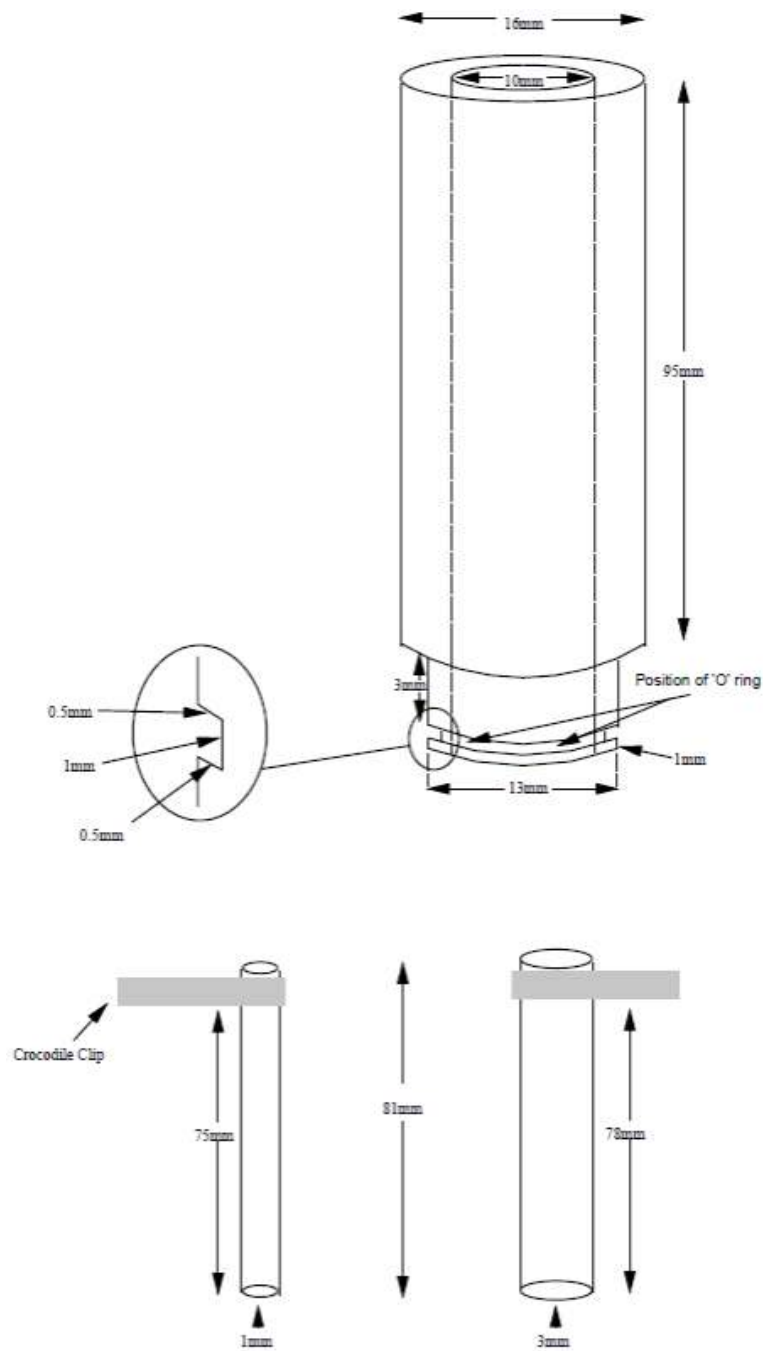
피부 TER 시험장치(그림 1)와 시험에 사용된 PTFE (PolyTetraFluoroEthylene), Receptor tube, 전극의 크기(그림 2)는 아래와 같다.



(가장 위에서 시계 방향으로)

- Crocodile 클립
- 내부(두꺼운) 전극
- 외부(얇은) 전극
- 피부 조각의 표피 부분
- 피부 조각의 진피층 부분
- MgSO_4 (154 mM)
- 고무 'O' 링
- MgSO_4 (154 mM)
- Receptor 챔버(일회용 튜브)
- 스프링 클립
- PTFE 튜브

그림 1. 피부 TER 시험을 위한 장치



Position of 'O' ring: 'O' 링의 위치

Crocodile Clip: Crocodile 클립

그림 2. PTFE (PolyTetraFluoroEthylene) 및 Receptor tube, 전극의 크기

본 장비에서 중요한 사항은 다음과 같다.

- PTFE 튜브의 내부 직경

- PTFE 튜브 및 Receptor 튜브에 관련된 전극의 길이, 전극이 피부조각에 닿지 않아야 하며, MgSO_4 용액에 들어가는 전극의 표준 길이
- PTFE 튜브에서 Receptor 튜브 내 MgSO_4 용액 양의 비율이 그림 2에 나타난 바와 같아야 함
- 피부 조각을 PTFE에 잘 고정하여, 피부의 특성에 대한 실제 전기저항 값의 측정이 이루어지도록 해야 함

1.3. 피부 평면조각(Disc)의 준비

1.3.1. 28 일령 ~ 30 일령 시험동물의 등외측쪽(Dorso-lateral)에서 20 mm 직경의 피부 조각을 떼어낸 후 피하 지방을 제거한다. 저장한 피부를 사용할 경우에는 음성 및 양성 대조군의 결과가 즉시 채취한 피부를 사용할 때와 동일하게 나타났을 때, 피부를 일정기간 저장한 후 사용할 수 있다. 랫드 한 마리에서 10 개 ~ 15 개의 피부 조각을 얻을 수 있다.

1.3.2. 피부 조각을 PTFE (PolyTetraFluoroEthylene) 튜브의 끝에 올려놓고, 이 때 표피가 튜브에 확실히 닿도록 한다. 고무로 된 ‘O’ 링을 튜브 끝에 놓아 피부를 고정하고 링 밖으로 나와 남는 부분은 잘라낸다. 고무 ‘O’ 링을 Petroleum jelly로 조심스럽게 고정시킨다. 튜브를 MgSO_4 용액(154 mM)이 들어있는 Receptor chamber 안에 스프링 클립으로 고정시킨다(그림 1). 피부 조각은 MgSO_4 용액에 완전히 잠기도록 한다. 관과 ‘O’ 링의 크기는 그림 2를 참고한다.

1.3.3. 본 시험 전에 각 피부 조각에 대하여 전기 저항성을 우선 확인한다. 두 개의 피부 조각의 전기 저항 값이 10 k Ω 보다 크게 나타나는 경우 시험에 사용할 수 있지만, 10 k Ω 이하인 경우에는 해당 동물에서 떼어낸 피부 조각을 사용할 수 없다.

1.4. 시험물질

액체 시험물질의 투여량은 150 μ L로 한다. 각 시험마다 양성 및 음성대조군을 두는데, 양성대조군은 10 M 염산(HCl)을 사용하고, 음성대조군은 증류수를 사용한다.

1.5. 숙련도 시험

본 시험법에 따라 시험을 수행하는 실험실은 사전에 이미 충분한 숙련도가 있음을 입증하여야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 12 종의 숙련도 시험대상 물질에 대해 시험하고 그 결과값이 표에 제시된 바와 일치하는 지를 확인하여야 한다.

표 1. 숙련도 시험물질 및 그 결과

화학물질 명	CAS 번호	화학적 분류	<i>In Vitro</i> 결과에 기반한 UN GHS Cat.	<i>In Vitro</i> 결과에 기반한 VRM Cat.	물리적 상태	pH
<i>In Vivo</i> Corrosives						
N,N'-Dimethyl dipropylenetriamine	10563-29-8	organic base	1A	6 \times C	L	8.3
1,2-Diaminopropane	78-90-0	organic base	1A	6 \times C	L	8.3
Sulfuric acid (10%)	7664-93-9	inorganic acid	(1A)1B/1C	5 \times C 1 \times NC	L	1.2
Potassium hydroxide (10% aq.)	1310-58-3	inorganic base	(1A)1B/1C	6 \times C	L	13.2
Octanoic (Caprylic) acid	124-07-2	organic acid	1B/1C	4 \times C 2 \times NC	L	3.6
2-tert-Butylphenol	88-18-6	phenol	1B/1C	4 \times C 2 \times NC	L	3.9
<i>In Vivo</i> Non-corrosives						
Isostearic acid	2724-58-5	organic acid	NC	6 \times NC	L	3.6
4-Amino-1,2,4-triazole	584-13-4	organic base	NC	6 \times NC	S	5.5
Phenethyl bromide	103-63-9	electrophile	NC	6 \times NC	L	3.6
4-(Methylthio)-benzaldehyde	3446-89-7	electrophile	NC	6 \times NC	L	6.8
1,9-Decadiene	1647-16-1	neutral organic	NC	6 \times NC	L	3.9
Tetrachloroethylene	127-18-4	neutral organic	NC	6 \times NC	L	4.5

약어: aq=aqueous; CASRN=Chemical Abstracts Service Registry Number; UN GHS=United Nations Globally Harmonised System; VRM=Validated Reference Method; ND=Not Determined.

2. 시험방법

2.1. 원리

피부 디스크의 상피부분에 시험물질을 24 시간까지 노출시키는데, 정상적인 각질층 구조 및 방어기능을 손상시키는 부식성 물질은 역치 이하의 피부 전기저항(TER)의 감소가 나타난다. 랫드의 TER cut-off value는 5 k Ω 이고, TER이 5 k Ω 부근에서 관찰되는 경우 염료를 이용하여 확인시험을 할 수 있다.

2.2. 시험물질투여

각 대조군 및 투여군은 세 개 썩의 피부 조각을 사용하여 시험물질을 20 $^{\circ}\text{C}$ ~ 23 $^{\circ}\text{C}$ 범위에서 노출시킨다. 24 시간 후에 30 $^{\circ}\text{C}$ 이하의 수돗물로 시험물질을 제거한다.

2.3. 피부 전기저항성 검사

2.3.1. 전기저항을 측정하기 전, 충분한 양의 70 % 에탄올로 표피를 처리하여 피부의 표면장력을 감소시킨다. 수초 후 에탄올을 제거하고 관과 조직에 MgSO_4 (154 mM) 용액 3 mL를 첨가하여 수분을 공급한다.

2.3.2. Data bridge 전극(Electrodes)을 피부 조각의 양쪽에 놓고, 피부 조각 당 저항성을 k Ω 으로 측정한다(그림 1). Crocodile clip 밑에 노출된 전극의 면적 및 길이는 그림 2에 나타난 바와 같다. 저항치를 측정하는 동안 내부 전극에 부착된 클립을 PTFE 튜브의 상부에 두고, MgSO_4 용액에 일정한 길이가 잠겨있도록 한다. 바깥쪽의 전극은 Receptor chamber의 안쪽에 두고 바닥에 닿을 수 있게 한다. 스프링 클립과 PTFE 튜브 사이의 간격은 저항 값의 측정에 영향을 줄 수 있기 때문에 간격을 일정하게 유지한다. 마찬가지로, 내부 전극과 피부조각 사이의 거리도 최소한으로(1 mm ~ 2 mm) 일정하게 유지한다.

2.3.3. 피부 표피면에 시험물질이 남아있을 때는 저항 값이 $20\text{ k}\Omega$ 이상으로 측정될 수 있다. 이 때, PTFE 튜브를 장갑을 낀 손으로 막고 10 초 정도 흔들어 남은 시험물질을 제거한 후, 새로운 MgSO_4 을 튜브에 넣은 후 새로운 저항 값을 측정한다.

2.4. 염료결합시험

2.4.1. 전기저항값 측정 후 MgSO_4 을 버리고, 피부 조각이 손상되었는지 검사한다. 큰 손상이 없다면, 10 % (w/v) Sulforhodamine B (Acid Red 52; C.I. 45100; CAS 번호 3520-42-1) 염료 희석액 $150\text{ }\mu\text{L}$ 를 각 피부 조각 표면에 2 시간 동안 처리한다. 그 후 각 피부 조각을 10 초 동안 수돗물로 세척하고, PTFE 튜브에서 제거한다. 이 피부 조각을 8 mL의 증류수로 채워진 바이알(Vial)에 넣고, 5 분 동안 부드럽게 교반하여 비결합 염료를 세척한다. 위의 과정을 반복한 후 피부 조각을 떼어 5 mL의 30 % (w/v) Sodium Dodecyl Sulphate (SDS)로 채워진 바이알에 넣고, $60\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 배양한다.

2.4.2. 배양 후 각 피부 조각을 제거하고, 남아 있는 용액은 $21\text{ }^\circ\text{C}$ 에서 8 분 동안 원심분리한다(상대 원심력 $\sim 175 \times g$). 상등액 1 mL를 30 % (w/v) SDS로 5 배 희석하고, 565 nm 파장에서 희석액의 흡광도를 측정한다.

2.4.3. 측정된 흡광도 값으로부터 각 피부에 포함된 Sulforhodamine B 염료의 양을 계산한다(565 nm에서 Sulforhodamine B 염료의 몰 흡광 계수는 8.7×10^4 임).

2.5. 결과 및 피부전기저항성 평가

2.5.1. 양성 및 음성 대조군 결과가 허용 범위 내인 경우 평균 TER을 결과로 사용한다.

- 음성 및 양성 대조군의 저항 허용 범위 값 -

대조군	시험물질	저항 범위(k Ω)
양성	10 M 염산	0.5 ~ 1.0
음성	증류수	10 ~ 25

2.5.2. 염료결합시험 시 양성 및 음성 대조군 결과가 허용 범위 내인 경우 평균 염료 결합 값을 결과로 사용한다.

- 음성 및 양성 대조군의 염료 허용 함유량 -

대조군	시험물질	염료 함유량 범위(μ g/disc)
양성	10 M 염산	40 ~ 100
음성	증류수	15 ~ 35

2.5.3. 다음과 같은 경우, 피부 부식성이 없는 시험물질로 간주한다.

- 평균 TER 값이 5 k Ω 보다 큰 경우
- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 조직에서 명백한 손상이 관찰되지 않고, 평균 피부 염료 함유량이 10 M 염산 처리한 양성 대조군에서 얻어진 염료 함유량 보다 유의적으로 낮은 경우

2.5.4. 다음과 같은 경우, 피부 부식성이 있는 시험물질로 간주한다.

- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 조각에 눈에 띄는 손상이 있는 경우
- 평균 TER 값이 5 k Ω 이하이고, 피부 조직에서는 눈에 띄는 손상이 관찰되지 않지만, 평균 피부 염료 함유량이 10 M 염산 처리한 양성 대조군에서 얻어진 염료 함유량 이상인 경우

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험물질에 대한 전기저항 값($k\Omega$), 평균 염료 함유량($\mu\text{g}/\text{disc}$), 음성·양성 대조군의 결과에 대한 반복 실험 결과를 모두 포함하여 개별 값, 그리고 평균을 표로 요약하여 나타낸다(개별적 자료는 평균 \pm 표준편차로 나타낸다).

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험 및 대조 물질 정보

- (1) 단일조성물질의 화학적 식별 자료(IUPAC 또는 CAS 번호 등), 순도, 불순물에 대한 화학 정보 등
- (2) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질의 화학 정보, 함유량 및 구성성분의 물리화학적 성질
- (3) 시험의 수행과 관련된 시험물질의 물리적 상태(기체, 고체, 액체 등), pH, 안정성, 수용성 등의 물리화학적 특성
- (4) 시험물질의 안정성, 저장 조건 등

2.4. 사용된 동물종/성별/공급원의 환경조건/피부 조직 채취에 대한 구체적인 사항

2.5. 시험조건

- (1) 시험 장비를 위한 표준곡선

- (2) 염료 결합 시험 수행 시 표준곡선
- (3) TER 측정을 위해 사용한 세부적인 시험절차
- (4) 염료 결합 시험 수행의 세부적인 시험절차(필요한 경우)
- (5) 변형된 시험 절차의 세부사항(있는 경우)
- (6) 평가범주에 대한 세부사항

2.6. 각 동물 및 각 개체(피부 조각)에 대하여 TER 및 염료 결합 시험(수행한 경우)
의 결과

2.7. 결과에 대한 고찰 및 결론

제20항 생체의 피부 부식성시험(인체 피부모델시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 인체피부모델을 이용한 생체의(*In vitro*) 피부 부식성 시험으로서, 화학 물질 또는 혼합물의 피부부식에 대한 영향을 평가하는 데 그 목적이 있다. 이 시험은 화학물질 또는 혼합물을 세계분류표시조화(UN GHS)의 분류법에 따라 부식성 물질과 비부식성 물질로 구분하는 데 필요한 정보를 제공한다.

* UN GHS; United nations globally harmonized system

2. 용어 정의

2.1. 피부 부식성(Skin corrosion)

시험물질을 일정시간 동안 피부조직에 노출시켰을 때 표피에서 진피까지 육안으로 관찰 가능한 조직 괴사 반응

2.2. 세포 생존율(Cell viability)

대조군의 생존 대비 시험물질 처리군의 생존을 비율(%)로 나타낸 것

2.3. 반수치사시간(ET₅₀)

일정한 시험물질의 농도에서 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시간

2.4. 반수치사농도(IC₅₀)

일정한 시간에서 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시험물질의 농도

II. 시험

1. 원리

3 차원 인체피부모델에 시험물질을 적용하여 특정 노출시간동안 세포의 생존율을 측정함으로써 부식성 화학물질을 확인할 수 있다. 인체피부모델을 이용한 부식성 시험의 원리는 부식성 물질이 확산 또는 침식에 의해 각질층을 통과하여 하층의 피부 조직에 비가역적 세포독성을 나타냄으로써 세포 생존율을 저하시키는 정도를 측정하는 것이다. 이때 세포독성 측정은 일반적으로 MTT법을 이용한다.

2. 시험의 준비

2.1. 인체피부모델

(1) 종류

생체의 피부 자극성 시험을 수행하기 위해서는 인체피부모델을 사용한다. OECD에서 그 적정성이 검증된 모델로서 상업적으로 구입이 가능한 EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, epiCS® 및 LabCyte EPI-MODEL24 등을 시험법에 사용하며, 이외의 인체피부모델을 사용하여 화학물질 등록 등 규제관리의 목적으로 피부자극성 시험결과를 생산하고자 할 때는 해당 인체피부모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질보증 및 검증자료를 제출하여야 한다.

(2) 일반조건

일반적으로 인체피부모델을 제작하기 위해서는 비형질전환(Non-transformed) 케라틴세포를 사용하여야 한다. 피부모델은 각질층(Stratum corneum) 아래에 다수의 표피 세포층(Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)이 존재하여야 하며, 각질층은 필수지방층을 가진 여러 층으로 구성되어 세포독성 지표물질(Sodium Dodecyl Sulfate, SDS 또는 Triton X-100)의 침투를 방지하기 위해 견고한 기능적 장벽을 가진 구조라야 한다. 또한 미생물 등(박테리아, 바이러스, 미코플라즈마, 곰팡이 등)에 의해 오염이 되지 않아야 한다.

(3) 기능조건

- **생존율** : 인체피부모델의 생존율은 MTT법으로 측정하며 이때 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군의 흡광도 최고치와 최저치에 대한 기준은 아래 표 1을 만족하여야 한다. 음성대조군의 세포 생존율은 시험물질 노출기간 동안 안정적으로 유지되어야 한다. MTT법에 사용되는 용매의 흡광도는 충분히 낮아서 세포생존율의 측정을 방해하지 않아야 하며 용매만의 흡광도는 0.1 이하여야 한다.

표 1. 음성대조군에 대한 MTT법에서의 흡광도 범위

인체피부모델	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™ (SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™ SCT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	≥ 0.7	≤ 2.5

- **방어벽 기능** : 인체피부모델의 각질층은 세포독성 지표물질(SDS 또는 Triton X-100)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 충분히 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 이때 방어벽 기능의 정도는 IC₅₀이나 ET₅₀으로 나타낼 수 있는데 그 기준은 표 2와 같다.

표 2. 인체피부모델의 적정성 판단기준

인체피부모델	시험조건	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™	SDS로 18 시간 처리	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 8.7 hours
SkinEthic™	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 hours	ET ₅₀ = 10.0 hours
epiCS®	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 2.0 hours	ET ₅₀ = 7.0 hours
LabCyte EPI-MODEL24 SCT	SDS로 18 시간 처리	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL

- **재현성** : 오랜 기간에 걸쳐 음성대조물질 및 양성대조물질에 대한 시험결과가 시험기관에서 재현성 있게 확인되어야 한다. 음성 대조물질(비부식성물질) 및 양성 대조물질(부식성물질)의 목록은 표 3과 같다.

표 3. 인체피부모델의 기능 재현성을 확인하기 위한 숙련도물질 목록

UN GHS 분류 (<i>In vivo</i>) ¹⁾		화학물질명
부식성	1A	Bromoacetic acid (79-08-3) Boron trifluoride dihydrate (13319-75-0) Phenol (108-95-2) Dichloroacetyl chloride (79-36-7)
	1B and 1C	Glyoxylic acid monohydrate (563-96-2) Lactic acid (598-82-3) Ethanolamine (141-43-5) Hydrochloric acid (14.4%) (7647-01-0)
비부식성	NC	Phenethyl bromide (103-63-9) 4-Amino-1,2,4-triazole (584-13-4) 4-(methylthio)-benzaldehyde (3446-89-7) Lauric acid (143-07-7)

¹⁾ OECD TG 404에 따라 수행한 *In vivo* 시험결과임

- **품질관리** : 인체피부모델은 공급자가 제시하는 각 품질기준에 적합할 때에만 사용하여야 한다. 품질기준은 IC₅₀ 및 ET₅₀로 판단하며 각 인체피부모델의 기준은 표 2에서 제시된 바와 같다.

3. 시험방법

3.1. 인체피부모델 배양

인체피부모델의 배양은 공급자의 프로토콜에 따른다. 10 % 혈청 및 항생제를 포함하여 필요한 영양소가 적절히 함유된 배양배지를 사용하며, 피부모델에 따라 실온 또는 37 °C 및 5 % CO₂ 가 유지되는 세포 배양기에서 배양한다. 시험에 사용할 인체피부모델은 시험물질을 투여하기 전에 일정 시간동안 해당 실험실의 세포배양기에서 전배양 한다.

3.2. 시험물질 노출

시험물질은 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며 각 노출시간에 대해 대조물질과 시험물질마다 최소 2 개 이상의 인체피부를($n = 2$) 사용한다. 각 시험마다 양성 대조군과 음성대조군을 둔다. 시험물질의 적용방법은 인체피부모델에 따라 조금씩 차이가 있으며 부록에 제시된 바와 같다. 시험물질은 인체피부모델에 적정 분량을 고르게 적용하며 적정 분량 이상의 과량을 적용하여서는 아니 된다(예, 최소 $70 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 또는 $30 \text{ mg}/\text{cm}^2$). 고체물질을 적용할 경우 피부모델에 효과적으로 접촉할 수 있도록 탈이온수나 증류수를 피부 위에 도포해 준다. 필요한 경우, 고체는 시험 전에 분말로 분쇄하여 사용한다. 시험물질 노출이 종료되면 피부모델을 완충액이나 0.9 % NaCl로 세척한다. 매 시험마다 양성 및 음성대조군을 두는데, 양성대조군은 빙초산(Glacial acetic acid) 또는 8 N 수산화칼륨(KOH)을 사용하며, 음성대조군은 0.9 % NaCl 또는 증류수를 사용한다. 인체피부모델에 대한 시험물질의 노출은 3 분 노출과 60 분 노출의 2 개 노출군으로 나누어 시험한다. 다만, EpiSkin™의 경우 추가로 4 시간 노출군을 둔다.

3.3. 생존율 측정

세포 생존율 측정은 유효성이 입증된 정량적 방법을 사용할 수 있다. 가장 널리 사용하는 방법은 MTT법이며 정확성 및 재현성이 입증된 다른 방법을 적용하는 것도 가능하다. MTT법은 시험물질 처리 및 후배양이 끝난 인체피부모델에 적절한 농도(예, 0.3 mg/mL, 0.5 mg/mL 또는 1 mg/mL)의 MTT 용액에 넣고 3 시간 동안 CO₂ 세포 배양기에서 배양한 후 침전된 청색의 포르마잔 산물을 이소프로판올 용매(Isopropanol)로 추출하고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하거나, HPLC/UPLC 분광광도계를 이용하여 측정한다. 시험물질이 MTT 등 발색제와 직접 작용하여 흡광도 측정에 영향을 줄 경우에는, 시험물질에 의한 방해 작용을 보정하기 위하여 추가적인 대조군을 사용한다. 세포생존율은 음성 대조군의 흡광도에 대한 시험물질 처리군의 흡광도의 백분율로 구한다.

3.4. 판정

(1) 시험의 적정성

음성대조군의 흡광도 범위는 표 1의 기준에 적합해야 하며 각 인체피부모델의 적정성은 표 2를 만족해야 한다. 양성대조군을 처리한 경우 세포독성이 확인되어야 하며 동일 시험물질 및 동일 노출조건에서 처리된 인체피부모델간의 결과값이 30 % 이상 차이가 나지 않아야 된다. 이상의 기준을 만족하지 못할 경우에 그 시험은 다시 수행되어야 한다. 시험결과를 부식성과 비부식성으로 구분하기 위해서는 시험물질 노출 당 2 개의 인체피부모델($n = 2$)을 사용하면 충분하다. 그러나 시험결과가 판정기준값 근처에 몰려있어서, 각각의 결과가 부식성과 비부식성으로 서로 다른 결과를 초래할 경우에는 두 번째의 시험을 수행하며 두 번째의 시험에서도 같은 결과가 나올 경우 세 번째의 시험을 수행하도록 한다.

(2) 판정기준

부식성 및 비부식성에 대한 판정기준은 인체피부모델에 대한 시험으로부터 산출된 세포생존율에 따라 아래 각 인체피부모델별 판정기준에 따른다.

표 4. EpiSkin™을 사용한 경우의 판정기준

판정		생존율
부식성	등급 1A	3 분 노출시 35 % 미만
	등급 1B 및 1C	3 분 노출시 35 % 이상이면서 60 분 노출시 35 % 미만 또는 60 분 노출시 35 % 이상이면서 240 분 노출시 35 % 미만
비부식성		240 분 노출시 35 % 이상

표 5. 인체피부를 사용한 부식성 판정기준

판정	생존율
1 단계. EpiDerm™, SkinEthic™, epiCS® 및 LabCyte EPI-MODEL24	
부식성	3 분 노출시 50 % 미만
	3 분 노출시 50 % 이상이면서 60 분 노출시 15 % 미만
비부식성	3 분 노출시 50 % 이상이면서 60 분 노출시 15 % 이상
2 단계. 1단계에서 부식성 물질로 확인된 물질/혼합물에 대한 EpiDerm™	
등급 1A	3 분 노출시 25 % 미만
등급 1B 및 1C	3 분 노출시 25 % 이상
2 단계. 1단계에서 부식성 물질로 확인된 물질/혼합물에 대한 SkinEthic™	
등급 1A	3 분 노출시 18 % 미만
등급 1B 및 1C	3 분 노출시 18 % 이상
2 단계. 1단계에서 부식성 물질로 확인 된 물질/혼합물에 대한 epiCS®	
등급 1A	3 분 노출시 15 % 미만
등급 1B 및 1C	3 분 노출시 15 % 이상
2 단계. 1단계에서 부식성 물질로 확인된 물질/혼합물에 대한 LabCyte EPI-MODEL24	
등급 1A	3 분 노출시 15 % 미만
등급 1B 및 1C	3 분 노출시 15 % 이상

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험물질의 부식성 및 비부식성을 평가하기 위해 시험군 및 음성, 양성 대조군의 결과를 인체피부모델에 따라 각각의 개별값 및 평균값으로 표에 요약하여 나타낸다(생존율 자료는 평균 \pm 표준편차로 나타낸다). 시험에 사용한 인체피부모델의 종류에 따라 시험을 수행하여 얻은 세포생존율 결과 값을 바탕으로 표 4 및 표 5의 판정기준을 적용하여 부식성 및 비부식성 물질을 판정한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험물질 및 대조물질

- (1) 단일조성물질: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 순도, 불순물의 확인(적절하고 거의 실현 가능한 범위에서)
- (2) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물: 성분의 화학적 동일성, 함량 및 관련있는 물리·화학적 성질
- (3) 물리적인 성상, 수용해도 그리고 추가적인 관련있는 물리·화학적 성질
- (4) 가능한 경우 출처, 로트번호
- (5) 시험 이전에 시험/대조 물질의 처리(필요한 경우) (예, 가온 또는 분쇄 등)
- (6) 시험물질의 안정성, 사용 제한 날짜, 혹은 가능한 경우 재분석일
- (7) 보관조건

2.4. 시험조건

- (1) 사용한 인체피부모델(배치번호 포함)
- (2) 세포 생존율을 확인하기 위해 사용한 장비(예, Spectrophotometer)에 대한 보정 정보, 파장, 대역(band)
- (3) MTT 포르마잔 정량화에 사용되는 관 및 측정장치의 선형성 범위(해당되는 경우)
- (4) MTT 포르마잔 정량화 방법
- (5) HPLC / UPLC-분광광도계 시스템 사용 조건(해당되는 경우)
- (6) 사용한 피부 모델에 대한 유효성을 포함한 모든 정보
 - 생존율, 방어벽 기능, 형태, 재현성/예측성, 품질보증 자료
- (7) 인체피부 모델을 이용한 과거의 시험자료(Historical data)

- (8) 실험실의 수행 능력을 보여줄 수 있는 숙련도 물질에 대한 시험 결과 자료

2.5. 시험절차

- (1) 사용한 시험결과에 대한 세부사항(노출 후 세척정보 포함)
- (2) 사용된 시험물질 및 대조물질 용량
- (3) 노출시간 및 온도
- (4) MTT - 환원제 및 시험물질의 착색 확인에 사용되는 대조군에 대한 설명 (해당되는 경우)
- (5) 노출시간, 시험물질 및 대조군 당 사용한 인체피부모델의 수
- (6) 사용한 인체피부모델의 판단기준 / 예측 모델에 대한 설명
- (7) 시험 절차를 변경한 경우 그 세부사항(있는 경우)
- (8) 시험 실시 및 시험의 성립조건
- (9) 과거 참고자료를 기반으로 양성대조군 및 음성대조군의 평균 값 및 허용 범위
- (10) 양성대조군 및 음성대조군에 대한 인체피부모델(조직) 간의 허용 범위
- (11) 시험물질에 대한 인체피부모델(조직) 간의 허용되는 변동성

2.6. 시험의 결과

- (1) OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, 조직 생존율 백분율, 평균 조직 생존율, 조직간의 차이값, SD 및/또는 CV를 포함하여, 각 노출기간동안 조직 개별 시험 샘플에 대한 자료 표
- (2) MTT반응을 간섭하는 시험물질의 경우 이에 대한 대조 시험
- (3) 실행 및 허용 기준과 관련하여 시험물질 및 대조군물질 결과
- (4) 시험지침에서 제시되어 있지 않은 다른 반응
- (5) 시험결과에 대한 판정

2.7. 결과에 대한 고찰

2.8. 결론

부록 1

표 1. 각 인체피부모델 별 피부 부식성 주요 시험 방법

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
면적	0.38 cm ²	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.6 cm ²	0.3 cm ²
피부모델 수	노출 시간 당 최소 2 개	노출 시간 당 2 개 ~ 3 개	노출 시간 당 최소 2 개	노출 시간 당 2 개	노출 시간 당 2 개
노출용량 과 적용방법	<p>- 액체 및 점성체 : 50 μL \pm 3 μL (131.6 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 20 mg \pm 2 mg (52.6 mg/cm²), 0.9 % NaCl용액 100 μL \pm 5 μL 사용</p> <p>- 왁스상/점성체 : 50 mg \pm 2 mg (131.6 mg/cm²), 나일론 망 사용</p>	<p>- 액체 : 50 μL (79.4 μL/cm²), 나일론 망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 반고체 : 50 μL (79.4 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 25 mg (39.7 mg/cm²), H₂O 25 μL(또는 그 이상) 사용</p> <p>- 왁스상 : 15 μL의 H₂O로 적신 인체 피부 위에 약 8 mm 지름의 디스크모양으로 평평하게 적용</p>	<p>- 액체 및 점성체 : 40 μL \pm 3μL (80 μL/cm²), 나일론망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 고체 : 20 mg \pm 3 mg(40 mg/cm²), H₂O 20 μL \pm 2 μL 사용</p> <p>- 왁스상/점성체 : 20 mg \pm 3 mg (40 mg/cm²), 나일론 망 사용</p>	<p>- 액체 : 50 μL (83.3 μL/cm²), 나일론망 사용 (나일론 망을 사용하지 않아도 무방하며 사전 시험을 통해 결정)</p> <p>- 반고체 : 50 μL (83.3 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 25 mg (41.7 mg/cm²), 25 μL 또는 그 이상의 H₂O 사용</p> <p>- 왁스상/점성체 : 15 μL H₂O로 적신 인체 피부모델 위에 약 8 mm 지름의 디스크모양으로 평평하게 적용</p>	<p>- 액체 : 50 μL (166.7 μL/cm²)</p> <p>- 고체 : 50 \pm 2 mg (166.7 mg/cm²), 50 μL 의 H₂O 사용</p> <p>- 왁스 : 액체 및 점성 물질로 고 점도용 마이크로 피펫을 사용</p>

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
시험물 질과 MTT의 직접반 응 여부 확인시 험	시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 20 mg을 2 mL MTT 용액(0.3 mg/mL)과 혼합한 후 37 °C로 180 분 \pm 5 분간 5 % CO ₂ 세포 배양기에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함) → 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함	시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 25 mg을 1 mL MTT용액 (1 mg/mL)과 혼합한 후 37 °C로 60 분간 5 % CO ₂ 세포배양기에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함) → 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함	시험물질이 액체인 경우 40 μ L, 시험물질이 고체인 경우 20 mg을 1 mL MTT용액 (1mg/mL)과 혼합한 후 37 °C로 180 분 \pm 5 분간 5 % CO ₂ 세포배양기에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함) → 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함	시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 25 mg를 1 mL MTT용액 (1 mg/mL)과 혼합한 후 37 °C로 60 분 간 5 % CO ₂ 세포배양기에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함) → 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함	시험물질이 액체인 경우 50 μ L, 고체인 경우 50 mg를 500 mL MTT용액 (0.5 mg/mL)과 혼합한 후 37 °C로 60 분 간 5 % CO ₂ 세포 배양기에서 배양 (세포가 없는 상태에서의 발색여부를 확인하고자 함) → 용액이 청색/자색으로 변한 경우, 대사기능이 없는 죽은 세포에서의 발색정도와 실제 생존세포에서의 발색정도를 비교하여 생존율을 보정하도록 함
정색반 응 저해여 부 사전확 인	10 μ L(액체인 경우) 또는 10 mg(고체인 경우)의 시험물질을 90 μ L H ₂ O와 실온에서 15 분간 혼합 → 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함	50 μ L(액체인 경우) 또는 25 mg(고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H ₂ O와 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분간 혼합 → 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함	40 μ L (액체인 경우) 또는 20 mg (고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H ₂ O와 실온에서 60 분간 혼합 → 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함	50 μ L (액체인 경우) 또는 25 mg (고체인 경우)의 시험물질을 300 μ L H ₂ O와 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분간 혼합 → 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함	50 μ L (액체인 경우) 또는 50 mg (고체인 경우)의 시험물질을 500 μ L H ₂ O와 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분간 혼합 → 용액의 색이 변하면, 생존세포에서의 발색정도 (MTT없는 상태)를 확인하고 생존율을 보정하도록 함
노출 시간 및 온도	3 분, 60 분 \pm 5 분 240 분 \pm 10분 환기 가능 실온 (18 °C ~ 28 °C)	실온에서 3 분, 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분	실온에서 3 분, 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분	실온에서 3 분, 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분	실온에서 3 분, 37 °C의 5 % CO ₂ 세포배양기에서 60 분
세척	25 mL 인산완충용액 (2 mL 씩으로 세척)	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척	인산완충용액으로 약 20 회 정도 부드럽게 세척	인산완충용액으로 약 10 회 정도 부드럽게 세척

	EpiSkin™	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
음성대조군	50 μ L NaCl용액 (9 g/L) 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험	40 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L H ₂ O 모든 노출 시간마다 시험
양성대조군	50 μ L 빙초산 4 시간 노출경우에만 시험	50 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험	40 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L 8 N KOH 모든 노출 시간마다 시험	50 μ L 8 N KOH 1시간 노출경우에만 시험
MTT 용액	2 mL, 0.3 mg/mL	300 μ L, 1 mg/mL	300 μ L, 1 mg/mL	300 μ L, 1 mg/mL	500 μ L, 0.5 mg/mL
MTT 배양 시간 및 온도	37 °C, 5% CO ₂ 세포배양기에서 180 분 \pm 15 분	37 °C, 5 % CO ₂ 세포배양기에서 180 분	37 °C, 5 % CO ₂ 세포배양기에서 180 분 \pm 15 분	37 °C, 5 % CO ₂ 세포배양기에서 180 분	37 °C, 5 % CO ₂ 세포배양기에서 180 분 \pm 5 분
시험성분	EpiSkin™ EIT	EpiDerm™ SCT	SkinEthic™ RHE EIT	epiCS®	LabCyte EPI-MODEL24 SCT
추출 용매	500 μ L의 산성이소프로판올 (0.04 N HCl in isopropanol)	2 mL 이소프로판올	1.5 mL 이소프로판올	2 mL 이소프로판올	300 mL 이소프로판올
추출 시간 및 온도	빛 차단 후 실온에서 하룻밤	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(~ 120 rpm)	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(~ 120 rpm)	실온에서 진탕 없이 하룻밤 또는 실온에서 120 분 간 진탕(~ 120 rpm)	빛 차단 후 실온에서 하룻밤
OD (흡광도 값)	570 nm (545 nm ~ 595 nm) reference filter 없이 측정	570 nm (or 540 nm) reference filter 없이 측정	570 nm (540 nm ~ 600 nm) reference filter 없이 측정	540 nm ~ 570 nm reference filter 없이 측정	570 nm ~ 650 nm reference filter 측정

제21항 발암성시험

I. 개요

1. 목적

본 시험은 시험물질을 시험동물의 거의 전생애 기간 동안 연속적으로 반복 투여한 후 표적기관에서의 발암 유무를 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 발암성(Carcinogenicity)

적정 경로를 통하여 노출시켰을 때 시험동물에 신생물을 유발시키는 화학 물질의 성질

2.2. 용량(Dose)

투여된 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게(체중) 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.3. 회복군(Satellite group, Recovery group)

시험물질의 투여 종료 후 시험물질로 인한 독성증상이 지연, 유지 또는 회복되는 지를 확인하기 위하여 필요시 추가하는 동물군

2.4. 위관투여법(Gavage)

사료 또는 음용수를 통해 투여하지 않고 위장 튜브 또는 캐놀라를 이용한 강제적인 물질 투여방법

2.5. 빈사상태(Moribund status)

시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

II. 시험

1. 원리

시험동물의 전생애에 해당하는 기간 동안 여러 용량으로 시험물질(일반적으로) 매일 경구 투여한 후, 동물들의 독성증상과 신생물 병변의 발달에 대해 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1. 시험동물

- (1) 이 시험에서는 설치류인 랫드가 선호되며 마우스를 사용할 수도 있다. 이 시험보다 단기간의 독성시험에서 사용된 것과 동일한 계통의 동물을 이용하고 화학물질의 감수성 측면에서 선호되는 동물을 사용한다. 생후 8 주 이하의 건강한 수컷과 임신과 출산의 경험이 없는 암컷을 사용한다.
- (2) 각 시험군과 대조군은 암수 각각 50 마리 이상으로 한다. 동물들은 대조군과 시험군으로 무작위 배정하고, 성별 체중변화는 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다.
- (3) 개별 동물에게 고유 식별번호를 배정하고, 영구적인 방법으로 표시 한다. 실험 전 최소 7 일간 실험실 조건에 순화시키고 가능한 빨리 투여를 시작 한다. 대조군에 속하는 동물을 시험군과 동일한 방법으로 처치한다.
- (4) 중간 안락사는 12 개월째에 실시하며 신생물 변화 및 진행, 기전에 대한 정보를 기록한다. 중간 안락사 시킬 것으로 예정한 동물의 수만큼(보통 암수 각 10 마리) 동물 총 수를 더 준비한다. 질병 모니터링군은 질병상태 모니터링을 위해 추가할 수 있으며, 보통 암수 각 5 마리를 준비한다.

2.2. 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 구별하거나, 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취시킨다. 사료의 오염물질 여부에 대해 정기적으로 분석하고, 보고가 끝날 때까지 사료 표본을 보관한다.

3. 시험방법

3.1. 시험물질의 투여

- (1) 용량과 반응과의 관계를 알기 위하여 투여 용량은 3 단계로 한다.(주 1) 예비시험을 거쳐, 대조군에 비하여 10 % 정도의 체중감소가 나타나지만 중독에 의한 사망은 나타나지 않는 양을 최고용량으로 한다. 용량을 선정할 때에는 해당 용량에서 얻은 시험 자료가 OECD 국가 간의 규제요건(예, 유해 및 위해성평가, 분류 및 표지, 내분비계 장애평가 등)에 적절한 지를 고려하여야 한다.
- (2) 최고용량에서 보통 공비 2 배 ~ 4 배 간격으로 중간용량과 최저용량을 설정하며 대조군을 둔다. 시험물질을 투여하는 데 용매가 사용되면, 대조군에도 시험군에 사용된 최고 용적의 용매를 투여하여야 한다.
- (3) 원칙적으로 경구투여를 하며, 흡입이나 경피투여를 통한 시험도 가능하다. 경구투여시에는 시험물질을 사료나 음용수에 섞어 투여할 수도 있으며 위관투여법으로도 투여한다. 위관투여법을 통한 경구투여 시 시험물질을 일정한 시간에 1 일 1 회 투여하며, 시험물질의 양은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100g (체중)을 넘지 않도록 한다.
- (4) 사료나 음용수를 통한 투여의 경우 시험물질의 농도는 총 사료의 5 % (w/w) 이하로 제한되며, 사료 중 시험물질의 농도(mg/kg 사료 또는 ppm)와 동물의 체중에 대한 투여량을 주단위로 계산해야 한다.
- (5) 경피 투여의 경우 하루에 최소 6 시간 동안, 주당 7 일, 24 개월 동안 시험물질을 투여한다. 흡입노출은 하루 6 시간 동안 노출하며, 주당 7 일간 수행한다. 시험 계획에 합당한 근거가 제시되면 최대 노출기간은 조절될 수 있다.

3.2. 시험기간

시험동물의 거의 전생애에 걸쳐 투여한다. 보통 설치류에 대해 24 개월 이상 투여하는데, 마우스의 특정계통(AKR/J, C3H/J, C57BL/6J 등)은 18 개월이 적합하다. 각 성별에서 생존은 따로 고려하고, 시험의 종결은 저용량 투여군

이나 대조군의 생존동물 수가 25 % 이하로 떨어졌을 때 고려한다. 고용량 투여군에서만 독성에 의해 조기 사망하는 경우, 시험을 종결할 필요는 없다. 시험 시작 후 생존동물의 수가 발암성시험의 통계적 유효성을 확보하지 못할 정도로 줄어든 경우에는 더 이상 시험을 진행하지 않아야 한다.

3.3. 관찰사항

- (1) 매일(주 7일) 하루의 시작과 끝에 일반상태 및 사망의 유무를 관찰하고, 생존율을 산출한다. 위관투여 시, 시험물질 투여 후 효과가 예상되는 최고기를 고려하여 동물의 독성학적 관련이 있는 특이증상에 대해 하루 한번 추가적으로 확인한다. 종양이 발생할 경우에는 위치, 크기, 진행경과, 또는 손에 만져지는지 등을 기록한다.
- (2) 모든 동물은 시험 시작 시 체중을 측정하고, 처음 13 주간 최소 주 1 회, 그 후에는 최소 매달 측정한다. 사료섭취량, 사료효율 및 음용수 섭취량은 처음 13 주간은 최소 매주, 그 후에는 최소 매달 측정한다. 섭취량에 대해서는 시험물질을 음용수에 섞어서 투여할 때만 측정한다.

3.4. 검사항목

- (1) 혈액학 검사 및 생화학적 검사를 위한 혈액채취 및 뇨 분석은 중간안락사 및 시험 종결 시 각 군에서 성별로 최소 10 마리에 대해 수행한다.
- (2) 회복군을 제외한 시험에 사용한 모든 동물(도중에 사망하거나 안락사한 동물도 포함)을 해부하고 전 장기에 대해 육안관찰을 하고 모든 장기를 적절한 고정액에 보존한다.(주 2) 쌍을 이루는 장기는 두 개 모두 보존한다. 흡입 및 경피 투여에서도 경구에 대한 장기목록 그대로 적용한다.
- (3) 독성병리학적 검사를 실시한다.(주 3)
- (4) 시험 중 사망한 동물에 대해서는 그 원인을 조사한다. 또 일반상태가 매우 나빠져서 빈사상태의 동물은 즉시 안락사 시키고 부검한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 각 동물의 평가된 모든 시험결과는 표 형태로 요약하여 제시되어야 한다. 각 시험군 별 시험시작 시의 동물 수, 인도적 이유로 안락사 시킨 동물의 수, 시험 중 사망하거나 중간안락사 된 동물의 수, 사망하거나 인도적 안락사의 시간, 독성 증상을 보이는 수, 관찰된 독성 증상에 대한 설명, 독성작용의 발생시기, 기간 및 심각도, 병변을 보인 동물의 수, 병변의 종류 및 각 병변의 종류마다 보이는 동물의 백분율 및 진행경과를 요약한다.
- (2) 요약한 시험결과표에는 병변의 등급 및 독성효과나 병변을 보이는 동물의 평균과 표준편차(연속적인 시험결과에 대한)가 표시되어야 한다. 동시대조군의 시험결과가 예상을 벗어나면(과거의 대조 시험결과 보유 시) 동일한 시험실에서의 5 년간 생성된 동일연령 및 계통의 동물에 관한 선행연구 결과가 제출되어야 한다. 수치적 결과는 적절한 통계학적 수법을 이용하여 처리한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 이화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성

2.4. 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5. 시험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육환경, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량
- (6) 랫드가 아닐 경우 사용한 동물종에 대한 근거 및 적정성

2.6. 시험조건

- (1) 투여경로 및 투여량 선택근거, 투여에 대한 세부사항
- (2) 결과분석에 사용한 통계적 방법
- (3) 시험물질의 배합 및 사료준비의 세부사항
- (4) 준비한 시험물질의 농도, 안정성, 균질성에 대한 분석결과
- (5) 흡입 시 비부 또는 전신 노출에 대한 정보
- (6) 실제투여량(mg/kg(체중)), 사료/음용수 내 시험물질 농도(mg/kg 또는 ppm)에서 실제 투여량 변환계수
- (7) 사료 및 음용수의 품질에 대한 세부사항

2.7. 결과

2.7.1. 일반독성

- (1) 생존 자료
- (2) 체중 및 체중변화
- (3) 사료섭취량, 섭취효율 계산, 음용수 섭취량
- (4) 독성동태 자료(가능 시)
- (5) 검안경, 혈액학적, 임상화학적 검사(가능 시)

2.7.2. 임상관찰결과

- (1) 독성증상, 이상의 발생정도 및 점수, 심각도
- (2) 자연발생, 심각도, 임상적 관찰기간(일시적 혹은 영구적)
- (3) 장기무게 및 그들의 비율(가능 시)
- (4) 육안 관찰(이상의 발생정도 및 심각도)

2.7.3. 조직학적 관찰결과

- (1) 비신생물 및 신생물의 조직학적 관찰 결과
- (2) 육안 및 현미경을 통한 관찰 간 조직학적 상관관계
- (3) 모든 처리와 관련한 심각도 등급을 포함한 조직학적 관찰에 대한 세부적인 기술
- (4) 제 3 자의 보고서 검토

2.8. 결론

주 1) 투여량 선택 시 고려 사항

- (1) 투여량-반응에서 알려졌거나 의심되는 비선형성 또는 변곡점
- (2) 독성동태, 대사유도와 포화가 일어나는 용량범위, 또는 외부 및 내부 투여량들 사이에서의 비선형성 발생 여부
- (3) 전구병변, 효과지표, 생물학적 과정에서 근본적인 작용지표
- (4) 핵심적인 또는 의심되는 작용기작의 양상
- (5) 특별히 확실한 평가가 필요한 용량-반응곡선의 부분(예, 예상되는 BMD 또는 의심되는 역치범위)
- (6) 예상되는 인체노출 수준에 대한 고려

주 2) 병리학적 검사를 위한 보존 장기 목록

- (1) 심한 손상을 보이는 모든 병소, 심장, 췌장, 위(전위, 선위), 부신, 회장, 공장, 부갑상선, 말초신경, 고환, 부고환, 대동맥, 뇌(대뇌, 소뇌, 수질/뇌교 포함), 신장, 뇌하수체, 흉선, 맹장, 눈물샘(눈외), 전립선, 갑상선, 간, 직장, 응고선(Coagulating gland), 폐, 침샘, 기도, 결장, 림프절(표부 및 심부), 정낭, 골격근, 자궁(자궁경부 포함), 방광, 십이지장, 유선(암컷필수, 수컷은 해부가능 시), 피부, 눈(망막 포함), 식도, 척수(3단계 : 경부, 중흉부, 요추), 비장, 질, 담낭(랫드 외 종에 대해), 난소, 골수 단면 및/또는 신선한 골수, 하더샘(Harderian gland)
- (2) 선택사항 ; 치아, 혀, 상기도(코, 비갑개 및 부비강 포함), 요관, 요도, 관절 포함 대퇴골, 후각망울, 흉골

주 3) 조직학적 관찰을 위한 조직 목록

- (1) 고용량 투여군 및 대조군의 모든 조직
- (2) 시험 도중 사망하거나 중간 안락사된 동물들의 모든 조직
- (3) 종양을 포함하여 현미경으로 이상이 관찰되는 모든 조직
- (4) 고용량 투여군에서 처리와 관련하여 조직적 변화가 관찰된 경우, 모든 다른 용량 투여군에서 모든 동물들에게 관찰된 동일한 조직
- (5) 쌍을 이루는 장기의 경우(예를 들어 신장, 부신)는 장기 둘 다 관찰하여야 함

제22항 유전독성시험(박테리아를 이용하는 복귀돌연변이시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 살모넬라균의 히스티딘(Histidine) 요구성 변이(His⁻ → His⁺)와 대장균의 트립토판(Tryptophan) 요구성 변이(Trp⁻ → Trp⁺)를 지표로 하여 점돌연변이(Point mutation)를 야기하는 화학물질의 유전독성을 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 복귀돌연변이(Reverse mutation)

히스티딘이나 트립토판을 생합성하지 못하는 돌연변이 박테리아가 시험물질에 의해 각 아미노산의 생합성 기능을 복구하는 현상

2.2 S9 fraction

간 균질액을 9,000 g에서 원심분리하였을 때 생성되는 상층액

2.3 대사활성제(S9 mixture)

S9과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들의 혼합물

2.4 점 돌연변이(Point mutation)

하나의 뉴클레오타이드(Nucleotide)가 변환되어 나타나는 돌연변이(Mutation)로 DNA 전사(Translation) 단계에서 특정 단백질의 생성을 막거나 변형시키는 것

II. 시험

1. 원리

이 시험은 시험물질에 의한 DNA 염기쌍의 치환, 삽입, 결실과 관련된 점돌

연변이를 찾기 위해 수행되며, 필수아미노산을 합성하는 데 필요한 유전자 기능이 결손된 균주에 시험물질을 처리한 후 그 기능이 회복되는 것을 평가함으로써 화학물질의 유전자 돌연변이 유발성을 판단한다.

2. 시험의 준비

2.1 사용 균주

살모넬라균 *Salmonella typhimurium* ① TA1535, ② TA1537 또는 TA97a 또는 TA97, ③ TA98, ④ TA100, ⑤ TA102 또는 대장균 *Escherichia coli* [WP2 uvrA 또는 WP2 uvrA(pKM101)]의 최소 5 종의 균주를 사용하며 *S. typhimurium*의 4 종 균주(① ~ ④)를 포함해야 한다. 시험 균주의 민감성 및 변이원성에 대해 주기적으로 확인하고, 균주를 사용하지 않을 때에는 -70 °C 이하에서 보존한다. 배양 온도는 37 °C가 추천된다. 박테리아 배양은 지수기 후기나 정지상 초기(대략 10^9 개 세포/mL)까지 성장하도록 한다. 정지상 후기의 배양세포를 사용하지 않도록 하며 생존 박테리아가 반드시 고농도로 존재한 상태에서 시험을 수행해야 한다.

2.2 시험물질 및 조제

시험물질이 고형인 경우 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 가능한 박테리아에 노출시키기 직전에 희석하여 사용한다. 액체물질은 시험계에 바로 처리하거나 처리 전에 희석하여 사용한다. 시험물질은 보관기간이 설정된 경우를 제외하고는 가능한 시험 직전에 조제한 것을 사용한다. 시험물질 조제에 사용하는 용매의 선택은 수용성 용매/보조제를 우선적으로 고려한다. 물에서 안정하지 않은 물질을 시험할 때는 무수 유기용매를 사용한다.

시험물질을 용해 또는 분산시키기 위해 사용되는 용매/보조제는 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 하며, 시험균주의 생존과 S9 mixture의 활성화에 적합해야 한다. 잘 알려진 용매 또는 보조제 외의 것을 사용하는 경우, 그 적합성을 증명할 수 있는 자료를 첨부하도록 한다. 기체 또는 휘발

성 물질은 밀봉된 용기에서 적절한 방법으로 시험한다.

2.3 배지

적절한 최소한천배지(예, Vogel-Bonner 최소배지 E와 포도당을 함유한 것)와 히스티딘과 바이오틴, 혹은 트립토판을 함유한 상충한천이 사용된다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 농도

시험물질의 농도단계는 약 $\sqrt{10}$ 의 공비로 5 단계 이상의 농도에서 분석 가능한 결과를 얻을 수 있도록 설정한다. 세포독성이 있는 물질은 예비시험을 통해 복귀돌연변이 콜로니수가 감소하는 명백한 세포독성을 나타내는 농도를 최고 농도로 설정하고, 세포독성이 없는 물질인 경우는 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate의 농도를 최고 농도로 한다. 용해도가 낮아 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate의 농도까지 실험할 수 없고 세포독성이 없는 물질의 경우, 녹지 않는 농도 1 개 이상을 포함하여 시험한다. 한편, 5 mg/plate 또는 5 μ L/plate 농도 이하에서 세포독성이 있는 물질의 경우, 독성을 나타내는 농도까지 시험하도록 한다. 시험물질에 돌연변이원성을 가진 불순물이 상당량 포함되어 있는 경우에는 5 mg/plate 또는 5 μ L/plates 이상의 농도에서 시험할 수 있다. 시험물질에 의한 세포독성 및 침전물이 발생할 경우, 시험결과에 그 사항을 명시한다.

3.2 대조군

매 시험마다 대사활성계의 유·무에 관계없이 각 군주에 특이적인 양성 및 음성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하도록 한다. 양성대조군은 널리 사용되고 있는 변이원성 유발물질을 사용하도록 하고 적절한 농도를 선택해야 한다(주 1). 음성대조군은 시험물질을 함유하지 않은 용매 또는 보조제를 시험군과 같은 방법으로 처리한다.

3.3 대사활성계(S9 mixture)

간 효소의 유도제인 아로클로 1254(Aroclor 1254) 또는 페노바비탈(phenobarbital)

및 β -나프토폴라본(β -naphthoflavone)의 혼합물을 랫드에 투여하여 간에서 S9을 조제하고 사용 시에는 보조효소 등을 첨가하여 S9 mixture를 준비한다. 이때 S9 mixture 중 S9의 농도는 5 % ~ 30 %(v/v)범위에서 사용한다. 필요 시 S9 mixture를 2 농도 이상 사용할 수도 있다. 대사활성계의 선택과 조건은 사용하는 화학물질의 계열에 따라 달라진다. 아조계염료(Azo-dyes)와 디아조(diazo) 화합물은 환원성 대사활성계를 사용하는 것이 더 적절하다.

3.4 시험방법

사전배양법(Preincubation method) 또는 평판법(Plate incorporation method)으로 시험물질의 각 농도에 대해서 3 배 이상의 평판을 사용한다. 과학적 근거가 적정할 경우 2 배의 평판을 사용할 수도 있다. 음성대조물질은 원칙적으로 용매를 이용하고, 양성대조물질은 적절한 변이원성 물질을 이용한다. 대사활성계(S9 mixture)를 첨가한 시험조건에 있어서도 동일한 방법으로 시험을 실시한다.

모든 배양 평판은 37 °C가 유지되는 인큐베이터에 48 시간 ~ 72 시간 동안 균주를 배양하고 그 후 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니 수를 계수한다. 콜로니 수를 측정할 때 세포독성 및 침전물을 확인하고 기록한다.

(1) 평판법

대사활성계를 첨가하지 않은 평판법에서는 보통 시험물질/시험용액 0.05 mL 혹은 0.1 mL, 신선한 박테리아 배양체 0.1 mL(약 10^8 개 세포) 그리고 무균 완충용액 0.5 mL를 2.0 mL의 상층한천과 혼합한다. 대사활성계를 첨가한 시험에서는 보통 충분한 양의 S9(5 % ~ 30 % v/v의 농도범위 내)을 함유한 S9 mixture 0.5 mL을 상층한천 2.0 mL 및 박테리아와 시험물질/시험용액과 혼합한다. 각 튜브의 내용물을 잘 혼합한 후 최소한천배지 위에 붓는다. 상층한천배지는 배양 전에 고형화되도록 한다.

(2) 사전배양법

시험물질/시험용액을 시험균주(약 10^8 개 세포를 함유하는) 및 S9 mixture와 함께 혼합한 후(대사활성계를 사용하지 않은 경우 대사활성계 대신 무

균완충용액) 보통 20 분 동안(혹은 그 이상) 30 ℃ ~ 37 ℃에서 미리 배양한다. 보통 시험물질/시험용액 0.05 mL 혹은 0.1 mL, 박테리아 0.1 mL, S9 mixture 또는 무균완충액 0.5 mL를 상층한천 2.0 mL와 혼합한다. 사전 배양 시 시험관은 진탕기를 사용하여 폭기되도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

음성대조물질, 양성대조물질 및 시험물질을 처리한 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니의 수에 대한 실측값과 평균값 및 표준편차를 표시한다. 시험물질 노출에 따른 대사활성계 유·무와는 관계없이 최소 1 개 이상의 균주에서 각 평판의 복귀돌연변이 콜로니 수가 사용한 농도에서 농도 의존적이거나 하나 이상의 농도에서 재현성있는 증가를 보일 경우 양성으로 판정한다. 명확한 양성 결과의 경우, 확인시험은 요구되지 않지만 결과를 판단하기 어려울 때는 시험조건을 변경하여 확인시험을 진행하도록 한다. 한편, 음성 결과의 경우, 경우에 따라 확인시험이 요구될 수 있다.

2. 결과의 해석

양성 결과를 결정하기 위한 다양한 판단기준들이 있다. 즉, 시험농도를 높여보거나, 최소 한 종의 박테리아를 사용하여 대사활성 유/무 상태에서의 시험 반복횟수를 늘려보는 것이다. 시험결과가 생물학적 상관성이 있는지를 가장 먼저 살펴보아야 한다. 통계 결과만으로 양성반응 여부를 결정하지 않아야 한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 물리화학적 성상
- (4) 시험물질의 안정성

3.4 용매/보조제

- (1) 용매/보조제 선정의 근거 및 정당성
- (2) 용매/보조제에서 시험물질의 용해성 및 안정성(자료가 있는 경우)

3.5 균주

- (1) 사용한 균주
- (2) 배양 당 세포 수
- (3) 균주의 특징

3.6 시험 조건

- (1) 평판당 시험물질의 양(mg/plate 또는 μ L/plate), 농도 선택, 농도 당 평판 수에 대한 논리적 근거
- (2) 사용한 배지
- (3) 판정기준, 대사 활성계의 유형과 조성
- (4) 실험 절차

3.7 시험 결과

- (1) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (2) 침전의 징후
- (3) 각 평판의 계수결과

- (4) 복귀 돌연변이 콜로니의 수와 평균값 및 표준편차
- (5) 농도-반응 관계
- (6) 통계학적 분석
- (7) 본 시험결과에서의 음성대조군과 양성대조군의 결과(범위, 평균값, 표준편차 제시)
- (8) 과거의 시험결과에서의 음성대조군과 양성대조군 결과(범위, 평균값, 표준편차 제시)

3.8 결과에 대한 고찰

3.9 결론

주 1) 복귀돌연변이시험의 양성대조물질

구분	화학물질	
+S9	9,10-Dimethylanthracene (CAS 번호 781-43-1)	
	7,12-Dimethylbenzanthracene (CAS 번호 57-97-6)	
	Congo Red - 환원성 대사활성법 (CAS 번호 573-58-0)	
	Benzo(a)pyrene (CAS 번호 50-32-8)	
	Cyclophosphamide (monohydrate) (CAS 번호 50-18-0, 6055-19-2)	
	2-Aminoanthracene (CAS 번호 613-13-8)	
구분	균주	화학물질
-S9	TA1535 및 TA100	Sodium azide (CAS 번호 26628-22-8)
	TA98	2-Nitrofluorene (CAS 번호 607-57-8)
	TA1537, TA97 및 TA97a	9-Aminoacridine (CAS 번호 90-45-9) 또는 ICR191 (CAS 번호 17070-45-0)
	TA102	Cumene hydroperoxide (CAS 번호 80-15-9)
	WP2 uvrA 및 TA102	Mitomycin C (CAS 번호 50-07-7)
	WP2, WP2 uvrA 및 WP2 uvrA (pKM101)	N-Ethyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (CAS 번호 4245-77-6) 또는 N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine (CAS 번호 70-25-7) 또는 4-nitroquinoline 1-oxide (CAS 번호 56-57-5)
	플라스미드를 포함하고 있는 균주	Furylfuramide (AF-2) (CAS 번호 3688-53-7)

제23항 유전독성시험(포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질을 포유류 배양세포에 처리한 후 염색체의 구조적 이상이 유발되는지를 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 염색체 구조적 이상

세포분열 중기에 현미경으로 관찰되는 염색체의 구조적 변화(결실, 절편, 교환 등)

2.2 S9

간 균질액을 9,000 g에서 원심분리하였을 때 생성되는 상층액

2.3 대사활성계(S9 mix)

약물 대사효소의 활성화에 필요한 보조인자와 S9의 혼합물질

2.4 내재복제(endoreduplication)

DNA 복제의 S기가 끝난 후에, 핵이 유사분열을 하지 않고 또 다른 S기를 시작하여 4 개, 8 개, 16 개 등 2^n 개의 염색분체를 가진 염색체가 만들어지는 현상

2.5 배수성(polyploidy)

염색체 세트 중 낱개 염색체의 수치 변화와는 반대로, 모든 염색체 세트 수의 변화를 수반하는 수치적 염색체 이상

2.6 염색분체형 이상(chromatid-type aberration)

단일 염색분체의 파손이나 염색분체간의 파손 또는 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.7 염색체형 이상(chromosome-type aberration)

동일한 부위에서 양 염색분체의 파손 또는 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.8 염색분체 절단(chromatid break)

하나의 염색분체에서 명백히 정렬이 어긋나 분리된 것

2.9 염색분체 갭(chromatid gap)

하나의 염색분체에서 정렬이 아주 조금 어긋난 부분에 나타나는 비염색 부위

2.10 상대 세포수증가(RICC, relative increase in cell counts)

대조군 세포수증가 대비 화학물질 처리군 세포수증가를 백분율로 나타낸 것

$$RICC(\%) = \frac{(\text{처리된 배양에서의 세포수 증가(최종-시작)})}{(\text{대조군 배양에서의 세포수 증가(최종-시작)})} \times 100$$

2.11 상대 모집단 배가(RPD, relative population doubling)

대조군 세포 수 배가수 대비 화학물질 처리군 배가수를 백분율로 나타낸 것

$$RPD(\%) = \frac{(\text{처리된 배양에서의 집단 배가수})}{(\text{대조군 배양에서의 집단 배가수})} \times 100$$

2.12 유사분열지수(MI, mitotic index)

세포 집단에서 관찰되는 모든 세포 수 대비 유사분열 중기에 있는 세포 수의 비율

$$MI(\%) = \frac{(\text{유사분열 세포의 수})}{(\text{획득된 세포의 총수})} \times 100$$

2.13 염색체절단물질(clastogen)

세포 군집 혹은 개체에서 구조적 염색체 이상을 유발하는 물질

2.14 이수성(aneuploidy)

염색체의 정상적인 이배체(또는 반수체) 수에서 하나 혹은 그 이상의 일탈. 염색체 전체의 배수체는 포함하지 않음

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 생체외(*in vitro*) 시험법으로서 필요에 따라 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용한다. 그러나 외인성 대사활성계를 시험에 사용하여도 생체내(*in vivo*) 대사활성계를 완전히 구현하는 것은 아니므로 시험결과를 해석할 때는 이를 감안하여야 한다. pH 또는 삼투압의 변화, 배지 성분과의 상호작용 및 세포독성 등 과도한 시험 조건으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있으므로 이러한 조건은 피하도록 한다. 염색체 이상 유도 분석은 시험물질 처리 세포와 미처리 세포 모두에서 유사분열에 도달한 중기세포를 사용하여야 한다.

2. 원리

포유류 배양세포를 시험물질에 노출시킨 다음 적절한 시기에 콜히친(colchicine)이나 콜세미드(colcemid)로 처리하여 세포분열의 중기상태로 만들어 현미경을 통해 염색체 이상 및 염색분체 이상을 관찰한다. 배양세포는 대사활성계의 유·무 조건하에서 시험물질에 노출시킨다.

3. 시험의 준비

3.1 세포

다양한 세포주[chinese hamster ovary(CHO), chinese hamster lung(CHL), TK6 등], 일차 배양 세포, 사람 또는 포유동물의 말초혈액 림프구 등을 사용한다. 과학적으로 타당한 세포를 선택한다. 일차 배양 세포는 사람 유래의 것이 좋다. 사람의 말초혈액 림프구는 최근에 염색체 이상의 기초 발생률을 증가시킬 정도의 유전독성 물질에 노출된 적이 없는 젊고 건강한(대략 18세 ~ 35세) 비흡연자로부터 얻는다. 배양세포들은 시험물질을 세포 주기의 각각 다른 단계에 노출시켜야 하며 이를 위해 세포주는 세포를 대수증식의 성장 단계를 유지하도록 하고 말초혈액 림프구의 경우에는 분열을 유도해야 한다.

3.2 시험물질의 조제

고체 시험물질은 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 액체 시험물질은 직접 사용하거나 또는 희석하여 사용한다. 기체 혹은 휘발성 시험물질은 밀봉 배양용기를 사용하는 등 적절한 방법을 사용하여 시험한다. 조제물의 안정성에 대한 자료가 확보되지 않은 경우에는 시험 직전에 조제한다.

3.3 용매 또는 보조제

시험물질을 용해 또는 분산시키기 위해 사용되는 용매/보조제는 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것이어야 하며, 세포의 생존과 S9 활성에 적합해야 한다. 용매로서 우선 고려할 수 있는 것은 배양배지이다. 수용성 용매(생리식염수 또는 물)는 배지 중에서의 최종 농도가 10 %(v/v)를 넘지 않아야 하며 dimethyl sulfoxide(DMSO) 등 유기용매는 1 %(v/v)를 넘지 않아야 한다. 잘 알려진 용매/보조제 이외의 것을 사용하는 경우는, 이들이 용매로서 적절한지에 대한 관련 자료를 첨부하여야 한다.

3.4 배양조건

세포배양 기간 동안에는 적절한 배양 배지와 배양 조건(배양용기, 5 % CO₂ 및 37 °C)이 유지되도록 한다. 세포주는 본래의 염색체 수가 유지되는지 염색체의 안정성을 정기적으로 확인하여야 하며 마이코플라스마(mycoplasma) 오염이 일어나지 않아야 한다. 만약 세포가 오염되었거나 염색체 수가 변했다면 시험에 사용하지 않는다.

3.5 배양준비

(1) 세포주

저장세포주로부터 일정 농도의 세포를 취하여 배양배지에 넣고 배양시킨다. 이때 취하는 세포의 양은 표본을 제작할 시간까지 대수증식기로 계속 성장할 수 있을 정도의 적절한 양을 취하여야 한다. 배양용기에서 단층이 형성될 때 까지 성장한 세포들은 시험에 사용하지 않도록 한다.

(2) 림프구

헤파린 등 항응고제를 처리한 전혈 또는 림프구는 시험물질에 노출시키기 전, phytohaemagglutinin(PHA) 등 유사분열촉진제로 세포분열을 유도한다.

3.6 세포증식 측정

세포독성이 나타나지 않는 적절한 농도에서 실험이 이루어졌는지 혹은 충분한 수의 세포가 분열 중인 상태에 있는 지 등을 평가하기 위해 세포증식을 측정한다. 세포독성은 대사활성계(S9 mix)를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 조건에서 모두 측정한다. 세포주의 경우에는 RPD 혹은 RICC를 이용하며, 배양 시간이 세포주기의 1.5 배 보다 큰 경우에는 RPD에 의한 세포독성 측정이 과소평가될 수 있으므로, RICC를 이용하는 것이 좋다. 림프구의 경우에는 MI 지표를 이용한다.

3.7 대사활성계(S9 mix)

사용되는 세포의 본래의 대사능력이 적절하지 않을 경우 외인성 대사활성계를 사용한다. 간 효소 유도제인 aroclor 1254 또는 phenobarbital 및 β -naphthoflavone의 혼합물질을 투여하여 간에서 S9을 조제하고 사용 시에는 보조효소 등을 첨가하여 S9 mix를 준비한다. S9 mix는 최종 시험배지에서 1 % ~ 2 %(v/v) 농도 범위로 사용하며 10 %(v/v)까지 증가시킬 수 있다.

4. 시험방법

4.1 시험물질 농도

- (1) 시험물질의 농도는 3 단계 이상의 농도를 설정하되, 각 농도에서의 세포독성, 세포 수 등이 시험의 성립조건에 적합하여야 한다.
- (2) 세포독성을 유발하는 시험물질의 경우에는, 약간의 세포독성을 나타내는 농도와 세포독성이 거의 없는 농도 범위를 포함도록 한다. 세포주의 경우에는 세포독성 지표(RICC, RPD)를 사용하여 55 % \pm 5 %의 세포독성을 나타내는 농도를 최고 농도로 하며 림프구의 경우 MI가 45 % \pm 5 %로 감소하는 농도를 최고 농도로 설정한다. 55 % \pm 5 %의 세포독성을 보이는 최고 농도에서만 양성반응이 나타난다면 결과관정에 주의를 요한다. 세포독성이 비교적 약한 물질인 경우는 2 μ L/mL, 2 mg/mL 또는 10 mM의 농도를 최고 농도로 하여 2 배 혹은 3 배 간격으로 농도를 설정한다.
- (3) 비교적 난용성인 물질의 경우, 녹지 않는 농도 이하에서 독성이 없다면 혼탁 또는 침전물이 형성되는 최저농도를 최고 농도로 한다. 이 경우 침전물은 육안으로 관찰할 수 있어야 하며 계수를 방해할 정도여서는 안된다.

- (4) 시험물질의 성분이 알려지지 않은 혼합물질, 생물학적 추출물, 환경 추출물 등의 경우에는 혼합물질의 농도를 높일 필요가 있다(예를 들면 5 mg/mL). pH 혹은 삼투압을 현저하게 변화시키는 농도는 피해야 한다.

4.2 대조군

매 시험마다 대사활성계의 유·무 조건 하에서 적절한 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하여야 한다. 실험실에서는 양성 대조물질을 시험 프로토콜에 따라 시험하였을 경우 염색체 이상을 유발하며 아울러 외인성 대사활성계는 그 유효성을 나타내고 있다는 것을 보여주어야 한다. 양성 대조군은 염색체 이상을 유발하는 물질로 이미 널리 알려진 것을 사용하여야 한다(표 1).

표 1. 포유류 배양세포를 이용하는 염색체이상시험의 양성 대조물질

구분	화학물질	CAS 번호
-S9	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
+S9	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0

4.3 시험물질의 처리 및 표본의 제작

- (1) 다음의 3 가지 시험, 즉 대사활성계 유·무 경우에 대한 단기 시험 및 대사활성계를 포함하지 않는 장기 시험을 모두 수행하여야 음성 결과로 결론을 내릴 수 있다. 3 가지 시험 중 하나라도 양성이 나오는 경우, 다른 시험을 더 이상 진행할 필요가 없다.
- 대사활성계를 포함하지 않는 조건에서 세포를 시험물질과 3 시간 ~ 6 시간 배양하며, 배양 시작부터 1.5 세포주기에 해당하는 시점에 염색체 표본을 제작한다.
 - 대사활성계를 포함하는 조건에서 세포를 시험물질과 3 시간 ~ 6 시간 배양하며, 배양 시작부터 1.5 세포주기에 해당하는 시점에 염색체 표본을 제작한다.

- 대사활성계를 포함하지 않는 조건에서 시험물질을 연속적으로 배양하면서, 1.5 세포주기에 해당하는 시점에 염색체 표본을 제작한다.

(2) 음성/용매 대조군을 포함하여 각 농도 당 적어도 2 배 이상의 배양 플레이트를 처리한다. 염색체 표본 제작에 앞서 1 시간 ~ 3 시간 전에 배양 세포에 콜세미드(혹은 콜히친) 처리를 한 후 염색체 표본을 제작한다. 유사분열 세포들은 배양용기로부터 쉽게 분리되기 때문에, 염색체 이상이 나타날 가능성이 있는 세포가 처리 종료 시에 유사분열중인 경우 표본제작에서 배제될 수 있으므로 주의를 요한다.

4.4 염색체 이상의 관찰

용량 당 300 개의 분열 중기 상에 대하여 염색체의 구조적 이상(염색체형 이상, 염색분체형 이상으로 구분)을 가진 세포의 출현율을 구하며, 각 유형별 구조적 이상(절단, 교환)의 수와 출현빈도를 기록한다. 염색체의 수적 이상이 관찰되는 경우 별도로 기록한다. 갭, 배수성 및 내재복제 등의 빈도를 기록한다. 염색체 이상의 분석은 숙련된 연구원에 의해서 수행되어야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

1.1 결과의 처리

염색체 이상이 발현된 세포의 백분율을 구한다. 대조군 및 처리군 모두에 대하여, 염색분체형 이상 및 염색체형 이상을 모두 하위 유형(절단, 교환)으로 분류하여 그 수와 출현빈도를 각각 표시하여야 한다. 갭은 별도로 기록하고, 염색체 이상의 총 빈도수에는 포함시키지 않는다. 배수성 또는 내재복제가 나타날 경우 백분율로 표시한다. 대조군, 양성 대조군 및 처리군 모두에 대하여 세포독성 정도를 기록한다.

1.2 시험의 성립 조건

시험이 적절하게 수행되었는지에 대한 판단은 다음 기준에 따른다.

- (1) 본 시험에서 수행한 음성 대조군의 결과는 해당 실험실에서 그 동안 수행하여 왔던 기존의 음성 대조군의 결과와 유사한 범위 내에 있어야 한다.

- (2) 본 시험에서 수행한 양성 대조군의 결과가 해당 실험실에서 수행하여 왔던 기존의 양성 대조군의 결과와 유사한 범위에 속하며 아울러 음성 대조군에 비해 통계학적으로 유의하게 증가하여야 한다.
- (3) 용매 대조군 내의 세포증식 기준이 충족되어야 한다.
- (4) 3 가지 실험 조건들(+S9 또는 -S9 상태에서 3 시간 ~ 6 시간 노출, -S9 상태에서 1.5 증식주기 후 표본제작 시 까지 노출)중 하나라도 양성을 나타내지 않는 한, 3 조건을 모두 시험하여야 한다.
- (5) 적절한 세포 수와 농도에 대한 분석이 가능하여야 한다.
- (6) 최고농도를 선정하기 위한 기준이 적합하여야 한다.

1.3 결과의 평가와 해석

- (1) 시험물질이 다음에 제시하는 시험의 조건을 모두 충족한다면 그 시험물질은 양성인 것으로 간주한다.
 - ① 시험농도들 중 최소 하나 이상의 농도에서 본 시험과 동시에 수행된 음성 대조군의 결과에 비해 염색체 이상이 통계학적으로 유의하게 증가하였다.
 - ② 증가되는 패턴이 농도 의존적으로 나타났다.
 - ③ 결과 중 하나라도 해당 실험실에서 그간 수행해온 기존의 음성 대조군의 결과를 벗어나는 분포를 나타내었다.
- (2) 시험물질이 다음의 모든 기준을 충족한다면 시험물질은 음성인 것으로 간주한다.
 - ① 시험 농도 중 어느 것도 해당 실험실에서 그간 수행해온 기존 음성 대조군의 결과와 비교하였을 때 통계학적으로 유의하게 염색체 이상을 증가시키지 않았다.
 - ② 적절한 경향성 시험으로 평가하였을 때 농도 의존적인 증가가 없다.
 - ③ 모든 결과들은 해당 실험실에서 그간 수행해 온 기존의 음성 대조군의 결과의 분포 범위 내에 있다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별정보 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 물리화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 시험물질의 용매 내에서의 용해도와 안정성
- (6) 시험물질이 가해진 배양배지 내에서의 pH, 삼투압, 침전의 측정

2.4 용매/보조제 종류 및 선정근거

2.5 사용한 세포에 대한 정보

- (1) 세포의 유형과 출처
- (2) 핵형 특성과 사용되는 세포 유형의 적합성
- (3) 세포주 내 마이코플라스마 오염여부
- (4) 세포주기, 배가시간(doubling time) 또는 세포증식 지수
- (5) 혈액 기증자의 성별, 나이, 기타 관련정보
- (6) 전혈 혹은 분리 림프구
- (7) 사용된 유사분열 유발물질
- (8) 세포주의 계대 수
- (9) 배양세포의 유지 방법
- (10) 세포주 원래의 염색체 수

2.6 시험조건

- (1) 분열 중기 정지 물질의 식별정보, 농도, 처리기간
- (2) 시험물질의 처리 농도
- (3) 농도 선정 및 반복 수 선정의 근거
- (4) 배지조성, CO₂ 농도, 습도
- (5) 용매 및 시험물질의 양
- (6) 배양온도 및 배양 시간

- (7) 시험물질 적용기간 및 처리 후 표본제작 시간
- (8) 접종 시 세포 밀도
- (9) 대사활성계의 종류 및 구성
- (10) 양성 및 음성 대조물질
- (11) 시험의 성립조건
- (12) 염색체 이상 계수 기준
- (13) 분석된 분열 중기 상 세포의 수
- (14) 세포독성 판정방법
- (15) 양성, 음성, 결정보류에 대한 판정기준
- (16) pH, 삼투압, 침전을 측정하는 데 사용된 방법

2.7 시험결과

- (1) 처리된 세포의 수, 각 배양으로부터 얻은 세포의 수(세포주의 경우)
- (2) 세포독성 지표(RPD, RICC, MI 등)
- (3) 침전의 징후와 형성 시간
- (4) 각 처리군 및 대조군의 염색체 이상을 갖는 세포 수와 염색체 이상의 종류
- (5) 염색체 수의 변화(배수성 등)
- (6) 농도-반응관계
- (7) 음성 및 양성 대조군 결과
- (8) 기준에 축적된 음성 및 양성 대조군 결과의 범위, 평균, 표준편차 등
- (9) 통계분석법

2.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제24항 유전독성시험(포유류 골수세포를 이용하는 소핵시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 포유류의 골수 및 말초혈액의 미성숙 적혈구에서 소핵 생성을 측정함으로써, 시험물질의 생체 내 노출에 의해 유발되는 염색체 또는 유사분열기관의 손상을 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 소핵(micronuclei)

세포분열의 말기상태에서 핵으로부터 분리된 염색체의 조각 또는 온전한 염색체로 구성된 작은 입자

2.2 다염성(미성숙) 적혈구(polychromatic or immature erythrocyte)

혈구 모세포의 발생 중간 단계에서 형성된 적혈구. 세포 안에 잔류 RNA가 존재하기 때문에 Wright's Giemsa와 같은 염색제의 청색 혹은 적색 성분에 의해 염색됨으로써 성숙 적혈구와 구별됨

2.3 정염성(성숙) 적혈구(normochromatic or mature erythrocyte)

탈핵 후에는 잔류 RNA가 존재하지 않으며, 적아세포(erythroblast)의 탈핵 후 사라지는 일시적 세포 지표(short-lived cell markers)가 존재하지 않는 완전히 성숙한 적혈구

2.4 적아세포(erythroblast)

적혈구 발달의 초기 단계 세포로서 핵을 포함하고 있음

II. 시험

1. 원리

시험물질을 동물에 투여하고 적절한 시기에 골수 혹은 말초혈액 표본을 제작한 후 소핵을 함유한 미성숙 적혈구가 유도되었는지를 관찰함으로써 세포

유전학적 손상을 평가한다. 미성숙 적혈구에서 소핵 빈도가 증가하는 것은 구조적 혹은 수적인 염색체 이상이 발생하였음을 의미한다. 표본의 소핵은 현미경 계수, 이미지 분석(image analysis), 유세포분석(flow cytometry), 레이저 주사 혈구계산(laser scanning cytometry) 등으로 분석할 수 있다. 필요한 경우, 소핵을 구성하는 염색체의 특성(전체 또는 부분 염색체)을 구분하기 위해 동원체(kinetochore) 혹은 중심립 DNA(centromeric DNA)를 추가적으로 분석할 수도 있다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

- (1) 시험동물로는 랫드 또는 마우스를 사용한다. 약 6 주령 ~ 10 주령의 젊은 성체 동물을 이용하되, 시험동물의 체중 차이는 각 성의 평균 체중의 20 % 가 넘지 않도록 한다. 동물 수는 시험군 당 최소 5 마리 이상을 사용하고 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다.
- (2) 어느 성별을 사용해도 좋으나 성별에 따른 감수성의 차이가 있을 것으로 판단되는 자료가 있다면, 암·수 모두 시험한다. 사람에서의 노출이 남녀 차이가 있다면 해당 성별의 동물을 사용한다.
- (3) 각 동물의 식별이 쉽도록 개개의 동물에 표시를 한다.

2.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적 또는 같은 성별의 작은 군 단위로 나누어 실시한다. 인공조명을 사용할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넬리쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고체물질은 적절한 용매나 보조제를 사용하여 용해 또는 분산시킨다. 액체 물질은 직접 사용하거나 또는 적절히 희석하여 사용한다. 조제된 시험물질의 안정성에 대해 알 수 없는 경우에는 시험 직전에 조제한다. 흡입 경로로 노출시키는 경우, 가스, 증기, 에어로졸 등의 형태로 투여할 수도 있다.

2.4 용매

용매는 투여 농도에서 독성이 없고 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것이라야 한다. 우선적으로 수용성 용매의 사용을 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매 이외의 것을 사용할 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시하도록 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

- (1) 시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 결정시험을 수행한다. 독성증상이 나타나는 용량을 최고 용량으로 하며, 적어도 3 단계의 용량을 설정한다. 용량 간격은 2 배 ~ 4 배의 공비를 두어 선정한다.
- (2) 만약 시험물질의 독성이 나타내지 않을 경우, 최고 용량은 투여기간이 14 일 이상이면 1,000 mg/kg/day, 투여기간이 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day 로 한다.
- (3) 시험물질이 독성(시험을 제한하는 전신 독성, 조혈계 독성 등)을 일으킨다면, 투여되는 최고용량은 최대내성용량(MTD, maximum tolerated dose)으로 하며 용량 수준은 최대용량에서부터 독성을 약간 일으키거나 일으키지 않는 용량까지의 범위를 포함하도록 한다. 최대용량은 골수에서의 독성을 유발하는 용량(예를 들어, 골수 혹은 말초혈액 총 적혈구 중 미성숙 적혈구의 비율 감소)으로 설정할 수도 있다.

3.2 한계시험

2,000 mg/kg/day 용량에서 독성(골수 분열 저하 포함)이 나타나지 않고, 구조-독성 상관성의 자료를 바탕으로 유전독성이 없을 것으로 예측되는 경우에는 3 개 농도군 모두를 설정할 필요가 없으며, 한계용량만으로 시험을 실시할 수 있다. 투여기간이 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day을 한계용량으로 하고, 투여기간이 14 일 이상이면 1,000 mg/kg/day을 한계용량으로 한다.

3.3 대조군

매 시험마다 양성(음성) 대조군을 포함하도록 한다. 숙련도 시험을 통해 기존 대조군의 결과 범위가 확보된 실험실에서는 매 시험에 양성 대조

군을 포함하지 않을 수도 있다. 양성 대조군이 매 시험에 포함되지 않더라도 계수를 위한 대조군(계수 방법에 따라 고정된 시료, 혹은 세포 현탁액 등)은 포함하도록 한다. 양성 대조군은 소핵을 유발하는 것으로 널리 알려진 물질을 사용한다. 양성 대조군에 사용하는 양성대조 물질의 종류는 표 1에 나타나 있다.

표 1. 포유류 적혈구를 이용하는 소핵시험의 양성 대조물질

화학물질	CAS 번호
Ethyl methanesulphonate	62-50-0
Methyl methanesulphonate	66-27-3
Ethyl nitrosourea	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamide(monohydrate)	50-18-0(6055-19-2)
Triethylenemelamine	51-18-3
Colchicine 또는 Vinblastine - 이수성유발물질	64-86-8 865-21-4

시험물질을 투여하는 데 용매를 사용한다면 음성 대조군에도 동일한 용매를 투여한다. 기존 대조군 결과를 통해 개체차 및 소핵 빈도 등에 대한 자료가 충분히 확보된 실험실의 경우, 매 표본 채취 시점마다 음성 대조군 표본을 채취하지 않을 수도 있으며, 이 경우에는 첫 번째 표본 채취에서 확보한 음성 대조군 표본을 이용한다. 말초혈액을 이용하는 경우, 음성 대조군 표본은 투여 전에 채취한 것을 이용할 수도 있다.

3.4 시험물질의 투여

- (1) 시험물질 투여는 시험물질이 인체에 노출되는 예상 경로를 고려하여 결정한다. 일반적으로 복강 투여는 권장하지 않으며, 반드시 필요한 경우에만 투여한다. 사료나 음용수를 통해 투여되는 경우에는 섭취 이후 화학물질의 영향이 나타나는 기간을 고려하여 시료를 채취한다.

- (2) 투여용량은 동물의 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않아야 하지만, 수용액의 경우 최대 100 g 당 2 mL 까지 사용될 수 있다. 매 24 시간 간격으로 2 회 이상 투여하는 것을 권장하며, 과학적으로 타당한 경우(시험물질이 세포 주기를 억제하는 등)에는 1 회만 투여할 수도 있다.
- (3) 시험물질 투여 후 각 군의 전 동물로부터, 골수세포 혹은 말초혈액의 적혈구 표본을 제작한다. 단회 투여 시, 투여로 인한 미성숙 적혈구의 소핵 생성을 측정하기 위해서는 적절한 표본 채취 시간을 선택해야 한다.

3.5 투여일정 및 표본 채취

투여 및 표본 채취는 다음 3 가지 중의 하나를 선택한다. 단, 과학적으로 필요한 경우 혹은 다른 시험과 병합하는 경우에는 투여 및 표본 채취 시간을 조정할 수도 있다.

- (1) 단회 투여의 경우 골수 표본은 각각의 동물군으로부터 적어도 2 회 채취하는데, 시험물질의 반감기가 예외적으로 길지 않는 한, 처리 후 24 시간 ~ 48 시간 사이에 적당한 간격으로 표본을 채취한다. 말초혈액 표본은 같은 동물군에서 적어도 2 회 채취하는데, 처리 후 36 시간 ~ 72 시간 사이에 적당한 간격으로 표본을 채취한다. 첫 표본 채취 시에는 모든 투여량군의 표본을 채취하고, 이후의 표본 채취는 최고 용량군만 수행한다. 한 시점의 표본에서 양성 반응이 확인되면, 추가 채취는 필요하지 않지만, 용량-반응에 대한 정보 등이 필요하다면 추가로 진행할 수도 있다.
- (2) 이틀간 투여하는 경우(예를 들어 24 시간 간격 2 번 처리), 골수에서의 표본채취는 마지막 처리 이후 18 시간 ~ 24 시간 사이에 1 회, 말초혈액의 경우에는 마지막 처리 이후 36 시간 ~ 48 시간 사이에 1 회 채취한다.
- (3) 만약 3 일 이상 매일 시험물질을 투여한다면(예를 들어 대략 24 시간 간격으로 3 번 이상 처리), 골수 표본은 마지막 처리 이후 24 시간 이내에 채취하고, 말초혈액 표본은 마지막 처리 후 40 시간 이내에 채취한다. 이와 같은 투여일정 및 표본 채취 방법은 유전자 코멧 분석법(comet assay)과 소핵 시험을 동시에 수행하거나 소핵시험과 반복투여독성 시험을 병합하여 수행할 때 적용할 수 있다.

3.6 관찰사항

시험동물의 일반증상관찰은 하루 1 회 이상, 투여 이후에 예상되는 효과의 최고 시점을 고려하여 실시한다. 투여 기간 동안 최소 하루에 2 회 이환율과 사망률을 조사한다. 모든 시험동물에서 시험 개시 시, 반복투여 시험 기간 동안 최소 1 주 1 회, 그리고 안락사 시에 체중을 측정한다. 1 주 이상의 시험에서는 매주 사료 섭취량을 측정한다. 시험물질이 음용수를 통하여 투여되는 경우 음용수의 교체 시마다 섭취량을 측정한다. 경우에 따라 동물의 체온을 기록한다.

3.7 표적장기 노출

골수가 시험물질에 노출되었는지 판단하기 위하여 필요 시 시험물질 혈중농도 측정을 위한 혈액 표본을 채취한다.

3.8 골수 및 혈액 준비

골수 세포는 안락사 시킨 직후에 동물의 대퇴골 혹은 경골에서 취한다. 말초혈액은 시험동물을 계속 생존시킬 필요가 있을 경우에는 꼬리 혈관 등으로부터 채취한다. 안락사 시킬 경우에는 심장천자나 큰 혈관으로부터 소량의 혈액을 채취한다. 골수나 말초혈액에서 추출된 적혈구 세포들은 분석 방법에 따라 즉시 염색하거나, 현미경 관찰을 위해 도말 및 염색하거나, 유세포분석을 위해 고정 및 염색한다. 가능하다면, 항-동원체(anti-kinetochore) 항체 혹은 중심립 DNA(centromeric DNA) 표지를 이용하여 소핵 생성의 기전이나 특성을 추가로 분석할 수 있는 방법도 이용한다.

3.9 분석

표본은 맹검(blind test)에 적합하도록 번호를 부여하고 수동 혹은 자동 분석으로 실시한다. 전체 적혈구(미성숙 + 성숙) 중의 미성숙 적혈구의 비율을 구하기 위해 각 동물마다 골수에서는 최소 500 개의 적혈구, 말초혈액에서는 최소 2,000 개의 적혈구를 계수한다. 소핵을 가진 미성숙 적혈구의 출현 빈도를 구하기 위해서는 동물 당 적어도 4,000 개의 미성숙 적혈구를 계수한다. 기존 대조군 자료에서 미성숙 적혈구의 소핵 발생 빈도가 0.1 % 이하라면 추가 계수를 고려한다. 현미경으로 계수하는 경우, 시험군에서 총 적혈

구 수에 대한 미성숙 적혈구의 비율은 용매대조군 값의 20 % 보다 작아서는 안되고, 유세포 분석 방법에 의해 얻은 CD71+ 미성숙 적혈구를 기록할 때에는 시험군에서의 비율이 용매 대조군 값의 5 % 이상이어야 한다.

랫드의 비장에서는 소핵을 함유한 적혈구를 제거하므로, 랫드 말초혈액을 이용하는 경우에는 RNA 함유량을 고려하거나 CD71+ 미성숙 적혈구를 계수하여, 가장 최근에 생성된 분획만을 분석하도록 한다. Acridine orange 염색 등 다른 방법을 이용할 수도 있다.

3.10 숙련도 시험

적어도 두 가지의 양성 대조군 및 음성 대조군을 이용한 소핵 빈도 측정을 통해, 재현성 있는 시험 결과를 얻을 수 있는지에 대한 숙련도 시험을 수행하여야 한다. 기존 대조군 자료가 확보된 경우에는 추가적으로 필요하지 않을 수도 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

각 동물 당 계수한 미성숙 적혈구(다염성 적혈구) 수와 소핵을 가지는 미성숙 적혈구의 수, 전체 적혈구 중 미성숙 적혈구 비율을 기록한다.

다음 기준에 해당하면 양성 반응으로 판정한다.

- (1) 적어도 1 개 이상의 용량 단계에서 소핵을 가지는 미성숙 적혈구의 빈도가 통계적으로 유의하게 증가
- (2) 이러한 증가가 적어도 한 시점의 표본들에서 용량 의존적으로 나타남
- (3) 이러한 결과들은 기존 음성대조군 결과 범위 외에 분포함

특정 표본 채취 시점에서 최고용량군의 결과만이 검토된 경우에는 동시에 진행된 음성 대조군과 비교하여 통계적인 유의성이 있으며, 기존 음성대조군 결과 분포를 벗어난다면 양성으로 판단한다. 소핵이 중심립 혹은 동원체를 포함하고 있다면 이수성 유발물질로 간주한다. 골수가 시험물질에 노출되었으나 소핵시험결과가 양성 판정 기준에 해당되지 않을 때는 음성으로 간주한다. 음성 혹은 양성 판정이 명확하지 않다면, 추가 시험을 수행하거나 전문가 판단이 필요할 수 있다.

2. 시험의 성립 조건

다음의 조건을 만족하는지 확인함으로써 시험이 적절히 수행되었는지 판단한다.

- (1) 동시 수행된 음성 대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합
- (2) 동시 수행된 양성 대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합하고, 음성 대조군과 확실한 통계적 차이를 나타냄
- (3) 투여군 및 결과 분석용 세포 수가 적절함
- (4) 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량이 설정됨

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

3.3.1. 물질 자료(출처, 순도, 로트 번호 등)

3.3.2 물리화학적 성질(안정성 등)

3.3.3 단일조성물질의 경우 다음 자료

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 그 외의 확보 가능한 물질 정보
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 관련 물리화학적 성질
- (3) 순도, 불순물의 확인

3.3.4 다조성물질, UVCB(unknown or variable composition, complex reaction products or biological materials)와 혼합물질의 경우 다음 자료

- (1) 위에서 언급한 물질의 화학적 특성
- (2) 구성성분의 정량적 구성 및 관련 물리화학적 성질

3.4 용매 정보

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성
- (3) 분석 방법

3.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 군별 평균 및 표준 편차를 포함하여 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 체중, 1 주 이상 연구의 경우 연구 중 개별 동물의 체중 및 사료 섭취량

3.6 시험조건

- (1) 음성(용매) 및 양성 대조군 설정 조건
- (2) 용량설정시험 조건
- (3) 투여용량, 투여경로, 투여기간 선정 근거
- (4) 투여방법, 투여일정
- (5) 사료 및 음용수 성적서
- (6) 골수 혹은 말초혈액 채취 시기
- (7) 독성의 관찰 또는 측정방법, 동물 당 관찰 세포 수
- (8) 표본 제작방법
- (9) 동물 당 관찰 세포 수
- (10) 양성 및 음성 판단 기준
- (11) 시험물질이 표적 장기에 도달했다는 것을 증명하기 위한 방법
- (12) 안락사 방법 및 진통 방법, 안락사 시점
- (13) 표본 추출 및 보존 절차
- (14) 시험의 성립 조건
- (15) 소핵이 전체 염색체를 가지는지 조각난 염색체를 가지는지 특징 짓기 위한 항-동원체 항체(anti-kinetochore antibodies) 혹은 중심립 특이적 DNA 표지(centromere-specific DNA probes)의 사용과 같은 방법

3.7 시험결과

- (1) 시험동물의 시험 전 및 시험 중 건강상태 및 독성 증상
- (2) 적혈구 중 다염성 적혈구 비율
- (3) 소핵이 관찰된 다염성 적혈구 수
- (4) 각 시험군에서 소핵이 관찰된 다염성 적혈구 수의 평균과 표준편차
- (5) 다염성 적혈구의 전체 적혈구 비율
- (6) 통계분석법
- (7) 음성 및 양성 대조군 결과
- (8) 기존 대조군 결과(과거 축적된 음성 대조물질 및 양성 대조물질 결과) 및 분포
- (9) 용량반응관계
- (10) 골수 노출 자료
- (11) 소핵이 전체 염색체를 가지는지 조각난 염색체를 가지는지를 나타내는 특징부여자료
- (12) 양성 혹은 음성 반응 충족 기준

3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제25항 유전독성시험(포유류 정원세포를 이용하는 염색체이상시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 포유류의 분열하는 정원세포 내 구조적 이상을 유발하는 물질을 확인하는 데 그 목적이 있다. 구조적 이상은 두 가지 유형, 즉 염색체형 이상 또는 염색분체형 이상 중 하나일 수 있다. 이 시험은 염색체 숫자의 변화를 측정할 목적으로는 사용되지 않는다.

2. 용어 정의

2.1 염색체 구조적 이상

세포분열 중기에 현미경으로 관찰되는 염색체의 구조적 변화(결실, 절편, 교환 등)

2.2 염색체형 이상(chromosome-type aberration)

동일한 부위에서 양 염색분체의 파손 또는 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.3 염색분체형 이상(chromatid-type aberration)

단일 염색분체의 파손이나 염색분체간의 파손 또는 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.4 갭(gap)

한 개 염색분체의 폭보다 더 작고, 염색분체의 정렬 불량이 최소인 비염색 손상부위

II. 시험

1. 원리

동물을 시험물질에 노출시킨 후, 콜히친(colchicine)이나 콜세미드(colcemid)로 처리하여 세포분열 중기상태로 만든다. 생식 세포인 정원세포 표본을 염색하여 중기 세포를 분석하여 염색체 이상을 관찰한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

건강한 수컷 마우스 사용을 권장한다. 동물 수는 시험군 당 최소 5 마리 이상을 사용하며 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다. 시험 개시는 8 주령 ~ 12 주령으로 하고, 시험동물의 체중 차이가 최소한이어야 하며 평균 체중의 20 %가 넘는 것은 사용하지 않는다. 각 동물의 식별이 쉽도록 개개의 동물에 표시한다.

2.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적으로 또는 같은 성별의 작은 군 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 한다.

2.3 시험물질의 조제

고체물질은 적절한 용매나 용제를 이용하여 용해 또는 분산시키거나 사료 또는 음용수에 섞어준다. 액체물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 흡입노출은 시험물질의 물리화학적 성질에 따라 가스, 증기 또는 고체/액체 에어로졸 형태로 사용한다. 안정성 자료가 확보되지 않을 경우에 시험물질은 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매

시험물질의 용매는 투여한 농도에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것으로 한다. 우선적으로 수용성인 용매 사용을 고려한다. 잘 알려진 용매 이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시한다.

2.5 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성(용매) 대조군을 포함시켜야 한다. 양성 대조군은 아래 표 1에 제시된 염색체이상 유발물질을 사용한다. 음성 대조군은 시험군과 동일 방법으로 용매만을 처리하고, 이때 염색체 이상이 나타나지 않아야 한다.

표 1 포유류 정원세포를 이용하는 염색체 이상 시험의 양성 대조물질

화학물질	CAS 번호
Cyclophosphamide(monohydrate)	50-18-0(6055-19-2)
Cyclohexylamine	108-91-8
Mitomycin C	50-07-7
Monomeric acrylamide	79-06-1
Triethylenemelamine	51-18-3

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여 일정

시험물질은 일반적으로 단회 투여한다. 경우에 따라 반복 투여도 가능하나 과학적인 근거를 제시하도록 한다. 최고 용량 투여군에서는 시험물질 투여 후 대략 24 시간 및 48 시간에 표본을 채취한다. 이외 용량 투여군은 처리 후 24 시간 또는 정원세포의 세포주기 길이의 시간에 표본을 채취한다. 표본 채취로부터 3 시간 ~ 5 시간 이전에 동물의 복강 내에 콜히친(colchicine)이나 콜세미드(colcemid)를 적정량 주입한다.

3.2 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 결정시험을 수행하여 최대내성용량(MTD, maximum tolerated dose)을 구한다. 시험물질의 용량단계는 3 단계의 용량을 설정한다. 투여량은 독성이 나타나는 최소 용량부터 무독성을 나타내는 용량범위를 포함하여야 한다. 시험물질의 독성이 없는 경우에는 단회투여의 경우 최고용량은 최대 2,000 mg/kg으로 하고, 독성이 있는 경우에는 최대내성용량을 최고용량으로 한다. 한계용량은 14 일 이상의 반복 투여에서는 1,000 mg/kg/day로 하고, 14 일 미만의 반복 투여에서는 2,000 mg/kg/day로 한다.

3.3 시험물질의 투여

인체 노출 경로를 고려하여, 사료나 음용수에 혼합하여 투여하거나, 피하, 정맥, 경구 또는 흡입 경로를 통해 투여한다. 복강 내 투여는 일반적으로 권장하지 않는다. 사료 또는 음용수에 혼합하여 단회 투여할 경우에는 사료나 음용수의 섭취시간을 충분히 고려한다. 경구 투여 시의 용액의 최대 부피는

시험동물의 크기에 따른다. 시험물질은 마우스 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않도록 하되, 수용액인 경우 2 mL까지 투여할 수 있다.

3.4 일반증상관찰

시험동물의 일반증상관찰은 1 일 1 회, 가능한 동일 시간에 관찰한다. 최소 하루 2 회 이환율과 사망률을 관찰한다. 시험 개시와 종료에 모든 동물의 체중을 측정하고, 반복 투여 시는 최소한 일주일에 1 회 측정한다. 주 단위의 시험에서는 사료 섭취량을 일주일 단위로 측정하고, 음용수로 시험물질을 투여할 경우에는 음용수 섭취량을 측정한다. 치사량이 아니더라도 시험 동물에게 심한 독성이 나타나면 시험 종료 전에 안락사 시킨다.

3.5 표본 제작

안락사 시킨 직후에, 저장성 용액에 고정된 정소로부터 생식세포 현탁액을 얻고 현탁액을 슬라이드에 도말하고 염색한다.

3.6 염색체 이상의 관찰

동물 당 최소 200 개의 분열 중기의 세포(시험군 당 최소한 500 개)에 대하여 분석한다. 분석에 앞서 모든 슬라이드를 암호화한다. 고정 작업 중 종종 염색체가 손실되거나 중기의 부분적 파괴가 나타날 수 있으므로, 계수된 세포들은 $2n \pm 2$ 이상의 중심립(centromere)을 포함해야 한다. 염색체와 염색 분체 이상은 따로 기록하고 그 형태를 분류 한다. 내재복제된 염색체를 가진 세포와 배수체 세포의 빈도를 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

개별 동물 자료는 도표 형식으로 제시한다. 동물 별로 염색체 구조적 이상 세포의 수 및 세포 당 염색체 이상의 수를 평가한다. 염색체 이상을 가진 세포 수가 투여 용량에 비례하여 증가하거나, 표본 제작 시기와 상관없이 어느 한 용량에서 염색체 이상을 나타내는 세포 수가 유의적으로 증가하면 양성 반응으로 판단한다. 결과를 평가하는 데 있어서 적절한 통계처리법을 사용할 수 있으나, 생물학적 유의성이 일차적으로 고려되어야 하며, 통계적 유의성만으로 양성 반응을 결정하지 않도록 한다. 음성 대조군과 비교해서

어느 용량에서도 유의적 증가가 없거나, 용량-반응 증가가 없고, 음성 대조군의 허용 범위 내에 있다면 음성으로 판정한다. 갭(gap)의 경우에는 별도로 기록하며, 염색체 이상의 총 빈도 수에는 포함시키지 않는다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 식별 자료 및 CAS 번호
- (2) 물리적 특성과 순도
- (3) 물리화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성

2.4 용매/용제 정보

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 용매/용제에 대한 시험물질의 용해도 및 안정성
- (3) 사료, 음용수 또는 흡입 제제의 조제
- (4) 물성 분석(안정성, 균질성, 농도)

2.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 종/계통 및 선정 근거
- (2) 동물의 수, 주령
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 표시 방법
- (5) 동물의 체중 범위, 단기시험의 경우 시험 시작 및 종료할 때 동물의 개별 체중, 장기 시험의 경우는 시험기간 중의 개별 체중과 식이 섭취, 각 군별 평균 체중 범위 및 표준 편차

2.6 시험조건

- (1) 음성(용매/용제) 및 양성대조군 설정 근거
- (2) 용량 설정 시험 근거
- (3) 투여용량 선정 근거
- (4) 투여경로 선정 근거
- (5) 시험물질의 조제 및 투여의 세부사항
- (6) 조직학적, 혈액학적 분석을 포함한 동물 독성 측정 방법과 관찰 빈도
- (7) 표적 조직에 도달 또는 일반 순환하는 시험물질의 확인 방법
- (8) 안락사 시점 선정 근거
- (9) 사료 및 음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량(mg/kg 체중/일)으로 환산
- (10) 사료 및 음용수 성적서
- (11) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점
- (12) 표본 추출 및 슬라이드 제작 방법
- (13) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (14) 분열중기 정지물질의 특성/농도/표본 채취 전 투여량
- (15) 이상 채점 기준
- (16) 동물 당 분석된 세포의 수
- (17) 양성 및 음성 판정 기준

2.7 결과

- (1) 시험 전과 기간 동안 독성 증상을 포함한 동물 상태
- (2) 시험동물 치사 또는 안락사의 체중과 기관 중량
- (3) 독성 증상
- (4) 유사 분열 지수
- (5) 정원 유사 분열 세포 대 최초 및 두 번째 감수 분열 중기의 비율
- (6) 각 동물에서 관찰된 이상의 유형과 수
- (7) 각 시험군 당 이상의 총 수 및 이상이 있는 세포의 수(평균, 표준 편차)
- (8) 용량반응관계
- (9) 통계분석법
- (10) 음성 반응 성립 조건 자료

(11) 음성 및 양성대조군 자료

(12) 배수성 변화

2.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제26항 급성 경구독성시험 (용량고저법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질에 의한 시험동물의 고통과 사망 수를 최대한 줄이고자 기존의 급성 경구독성시험을 대체하는 시험법으로 채택되었으며 최소한의 동물을 사용하여 시험물질을 경구투여하였을 때 나타나는 급성독성 증상을 관찰하는데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 급성 경구독성

시험물질을 24 시간 이내에 1 회 또는 수 회 경구투여한 후 나타나는 유해 영향

2.2 지연 사망

시험물질 투여 후 48 시간 이내에 사망(또는 빈사상태)에 도달하지는 않으나 그 후 14 일간의 관찰기간 동안 사망하는 경우

2.3 용량

투여하는 시험물질의 양. 일반적으로 단위는 시험동물의 단위무게(체중) 당 시험물질의 무게(예, mg/kg)로 표시

2.4 공비

시험물질 투여 후 동물이 생존하는 경우에는 다음 용량을 증가시켜 투여하는데 이때의 용량 증가비율이며 동물이 사망했을 경우에는 다음 용량을 감소시켜 투여하는데 이때의 용량 감소비율

2.5 GHS(Globally harmonized classification system for chemical substances and mixtures)

국제적으로 조화된 화학물질 및 혼합물의 분류 시스템

2.6 반수치사량(LD₅₀)

시험물질을 단회 경구투여 하였을 때 통계학적으로 50 %의 동물이 사망할 것으로 예상되는 투여량. LD₅₀ 값은 시험동물 단위 체중 당 시험물질의 무게(mg/kg)로 표시

2.7 한계용량

투여용량의 상한선(2,000 또는 5,000 mg/kg)

2.8 빈사상태

시험물질의 독성에 의하여 시험동물이 죽어가는 상태 또는 생존할 가망이 없는 상태

2.9 역전

어떤 용량 투여 시 반응이 없다가 다음 용량을 투여하였을 때 반응이 나타나거나, 그 반대의 경우(즉, 반응이 있었는데 그 다음 용량에서 반응이 없는 경우)

II. 시험

1. 원리

1.1 한계시험의 원리

한계시험은 최대 5 마리의 동물을 순차적으로 사용하는 시험이다. 투여 용량은 2,000 mg/kg(특수한 경우, 5,000 mg/kg)을 사용할 수 있다. 2,000 및 5,000 mg/kg의 용량을 사용하는 경우의 시험 절차는 조금 다르다

1.2 본시험의 원리

본시험은 시험물질을 정해진 용량순서에 따라 최소 48 시간 간격으로 동물에 단회 투여하고 사망여부를 관찰하는 시험이다. 첫 번째 동물에는 LD₅₀ 예상치보다 한 단계 낮은 수준의 용량을 투여한다. LD₅₀에 대한 정보가 없는 경우, 첫 번째 투여 용량은 175 mg/kg으로 한다. 첫 번째 동물이 생존하는 경우, 두 번째 동물에는 첫 번째 투여량에 공비를 적용하여 증가한 용량

을 투여한다(용량-반응 곡선의 기울기에 대한 정보를 바탕으로 공비가 정해진 경우 해당 공비를 적용하며 공비를 정할 수 없는 경우 3.2를 적용). 두 번째 동물이 죽는 경우, 그 다음 동물에는 종전에 적용시킨 해당 공비에 따라 감소시킨 용량을 투여한다. 다음 동물에 순차적으로 시험을 수행할지 여부 또는 용량결정 여부 등은 투여한 동물에 대한 사망여부를 48 시간 동안 주의 깊게 관찰한 후 결정하여야 한다.

시험물질 투여 후 동물번호, 투여량, 공비 및 사망동물의 발생여부 등을 OECD 가이드라인에서 제공하는 AOT 425 StatPgm 전산프로그램에 기입하여 전산프로그램의 지시에 따라 추후 투여할 투여량을 산출하며, 전산프로그램에서 투여중단 메시지가 출력되고 LD₅₀이 산출되면 투여를 종료한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

시험동물은 투여가 시작되는 시점에 8 주령 ~ 12 주령이 되는 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 앞서 투여한 동물의 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 시험은 한쪽 성을 사용하는데 암컷을 사용하는 것을 원칙으로 하며, 수컷을 사용할 경우 타당한 사유를 제시한다. 암컷은 임신과 출산의 경험이 없는 것을 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험 시작 전 최소 5 일 이상 실험실에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다. 각 동물의 개체 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 하고 사육하는 사육 상자의 개체식별을 위해 수용된 동물에 대한 정보를 제공하는 기록을 부착한다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 암컷과 수컷을 구별하여 사육하며 각 개체의 관찰이 용이하도록 케이지 당 사육 밀도가 높지 않도록 한다. 조명은 명/암이 12/12 시간이 되도록 조절하며, 먹이와 물을 적절히 공급한다.

2.3 시험물질

시험물질은 적당한 용매에 용해 또는 현탁시킨다. 시험물질은 수용액이 우선적으로 권장되나, 비수용성인 물질의 경우 오일(예, corn oil) 또는 다른 용매를 사용한다. 이때 사용하는 용매는 사전에 독성 여부와 물리화학적 특성이 잘 알려진 것을 사용한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 경구투여하는 시험물질의 투여 액량은 시험동물의 크기에 따라 다르나, 일반적으로 최대 1 mL/100 g(체중)을 넘지 않도록 한다. 다만 수용액의 경우는 2 mL/100 g까지 허용한다.
- (2) 투여는 1 회 투여를 원칙으로 하되 불가능할 경우 소량씩 나누어 실시한다. 이때 투여 간격은 24 시간이 넘지 않도록 한다.
- (3) 시험물질을 투여하기 전날 저녁부터 물을 제외한 먹이 공급을 중단하고, 절식 후의 체중을 측정하여 시험물질을 투여한다.(마우스의 경우는 투여 전 3 시간 ~ 4 시간 전부터 먹이 공급을 중단한다). 시험물질의 경구투여 후 3 시간 ~ 4 시간 후(마우스의 경우는 1 시간 ~ 2 시간 후)부터 먹이를 공급한다. 시험물질을 소량씩 나누어 투여할 경우, 투여 간격을 고려하여 소량씩 여러 번 물과 먹이를 적절히 제공한다.

3.2 한계시험 및 본시험

한계시험은 기존의 독성정보를 통해 시험물질의 독성이 없거나, 규제농도 이하로 낮을 것으로 판단되는 경우에 실시한다.

본시험은 시험물질 관련 독성학적 정보가 충분하지 않거나 독성이 강할 것으로 판단되는 경우에 실시한다.

(1) 2,000 mg/kg의 한계시험

해당 용량의 시험물질을 1 마리의 동물에 투여한다. 동물이 사망하면, 본시험을 수행한다. 동물이 생존하면, 시험물질을 다른 4 마리의 동물에 순차적으로 투여한다(총 5 마리). 5 마리 중 3 마리 이상이 사망하면 한계시험을

중단하고 본시험을 수행한다. 3 마리 또는 그 이상의 동물이 생존하면 LD₅₀이 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단하고, 투여를 종료한다. 동물이 예상외로 시험진행 후기(투여 후 48 시간 이후)에 사망하면 일단 투여를 중단하고, 생존동물에 대하여 비슷한 관찰기간 내에 사망이 발생하는지에 대한 관찰을 실시한다. 시험진행 후기에 사망한 동물은 최종 사망동물로 처리하여 평가한다.

결과는 다음과 같이 평가한다.

O = survival, X = death	
LD ₅₀ < 2,000 mg/kg인 경우	LD ₅₀ > 2,000 mg/kg인 경우
O XO XX	O OO OO
O OX XX	O OO XO
O XX OX	O OO OX
O XX X	O OO XX
	O XO XO
	O XO OO/X
	O OX XO
	O OX OO/X
	O XX OO

(2) 5,000 mg/kg의 한계시험

규제관리 측면에서 필요하다고 판단되는 경우, 5,000 mg/kg의 투여량을 고려할 수 있다. 해당 용량의 시험물질을 1 마리의 동물에 투여한다. 동물이 사망하면, 본시험을 수행한다. 동물이 생존하면, 시험물질을 다른 2 마리의 동물에 투여한다. 2 마리 모두 생존하면 LD₅₀이 5,000 mg/kg 이상으로 판단하고, 투여를 종료한다(다른 동물의 투여 없이 14 일간 관찰 실시). 2 마리 중 1 마리 사망 또는 2 마리 모두 사망하면 시험물질을 순차적으로 1 마리씩 추가적으로 2 마리의 동물에 더 투여한다. 3 마리 이상 사망하면 LD₅₀이 5,000 mg/kg 이하이고, 3 마리 이상 생존하면 LD₅₀이 5,000 mg/kg 이상으로 판단한다. 동물이 예상외로 시험진행 후기(투여 후 48 시간 이후)에 사망하고 다른 생존개체가 존재한다면, 일단 투여를 중단하고 생존동물에 대하여 비슷한 관찰기간 내에 사망이 발생하는지에 대한 관찰을 실시한다. 시

험진행 후기에 사망한 동물은 최종 사망동물로 처리하여 평가한다.

결과는 다음과 같이 평가한다.

O = survival, X = death	
LD ₅₀ < 5,000 mg/kg인 경우	LD ₅₀ > 5,000 mg/kg인 경우
O XO XX	O OO
O OX XX	O XO XO
O XX OX	O XO O
O XX X	O OX XO
	O OX O
	O XX OO

3.3 본시험

(1) 투여시간 간격

시험물질을 매번 1 마리의 동물에 각각 순차적으로 1 회 투여한다. 동물마다의 투여시간 간격은 일반적으로 48 시간으로 하며, 투여한 동물의 생존여부에 대한 확신이 설 때까지는 다음 단계의 투여를 보류한다. 투여시간 간격은 시험물질의 독성증상의 발현시간, 발현의 강약과 지속시간에 따라 적당히 조절할 수 있다.

(2) 투여량 설정

첫 번째 투여량을 결정하기 위해서는 구조적으로 유사한 물질의 시험결과 및 해당 시험물질에 대한 다른 독성 시험결과 등, 활용 가능한 정보를 최대한 이용하여 LD₅₀ 및 용량-반응 곡선의 기울기를 추정하여야 한다.

첫 번째 투여량은 LD₅₀의 예상치보다 한 단계 낮은 용량으로 설정한다. 첫 번째 투여동물이 생존하면, 두 번째 동물에는 한 단계 더 높은 공비 용량으로 투여한다. 반면에 첫 번째 동물이 사망 또는 빈사를 나타내면 두 번째 동물에는 한 단계 낮은 공비 용량으로 투여한다. 공비는 1/(용량-반응 곡선 기울기 추정치)의 반로그(Antilog)에 근거하여 설정하며, 시험기간 동안 이 값을 계속 유지한다(예 : 기울기 2에 해당하는 용량 진행 계수는 3.2이다). 시험물질의 기울기에 대한 정보가 없는 경우, 공비는 보통 3.2로 설정한다.

이 경우, 투여량은 1.75 mg/kg, 5.5 mg/kg, 17.5 mg/kg, 55 mg/kg, 175 mg/kg, 550 mg/kg, 2,000 mg/kg(조절이 필요한 경우, 1.75 mg/kg, 5.5 mg/kg, 17.5 mg/kg, 55 mg/kg, 175 mg/kg, 550 mg/kg, 1,750 mg/kg, 5,000 mg/kg)의 순서로 선택한다. 시험물질과 관련된 독성학적 정보가 없는 경우, 첫 번째 투여량을 175 mg/kg으로 설정하는 것을 원칙으로 한다. 동물이 시험물질에 대한 내성이 매우 높고 유동적일 경우(즉, 기울기가 2.0 미만)에는 공비를 높게(3.2 이상) 설정하고, 반면에 기울기가 매우 가파른 시험물질에 대해서는 공비를 낮게 설정한다.

(3) 투여중단 기준

시험물질을 일정 시간 간격(예, 48 시간)에 따라 투여를 지속하며, 다음과 같은 상황이 발생하는 경우에는 투여를 중단한다.

- ① 한계용량에서 연속적으로 3 마리의 동물이 생존하는 경우
- ② 연속적으로 투여한 6 마리의 동물에서 5 차례의 역전(생존/사망)이 일어나는 경우
- ③ 최소 4 마리의 동물이 첫 번째 역전(The first reversal)이 일어나고 정해진 유사성 비율(Specified likelihood-ratios)이 임계값(Critical value)을 초과하는 경우

LD₅₀과 기울기의 각종 조합의 다양성을 감안하는 경우, 시험의 역전이 발생한 후 4 마리 ~ 6 마리 동물을 사용하면 ③항의 시험중단기준을 만족할 수 있다. 그러나 시험물질의 용량-반응곡선의 기울기가 비교적 작을 때에는 동물수가 증가될 수 있다(최대 총 15 마리).

(4) LD₅₀값 계산

중단기준에 부합하는 경우, 시험 종료 시 확인된 시험 결과를 OECD 가이드라인에서 제공하는 AOT 425 StatPgm 전산프로그램에 기입하여 전산프로그램의 지시에 따라 추후 투여할 투여량을 산출하며, 전산프로그램에서 투여 중단 메시지가 출력되고 LD₅₀이 산출되면 투여를 종료한다(<그림> 참조). LD₅₀ 계산을 위한 소프트웨어는 OECD 홈페이지에서 다운로드 받아 사용할 수 있다[Acute Oral Toxicity (OECD Test Guideline 425) Statistical Programme (AOT 425 StatPgm) Version : 1.0, 2001.].

(5) 자연사망에 대한 처리

동물이 예상외로 시험진행 후기(투여 후 48 시간 이후)에 사망하면 일단 투여를 중단하고, 생존동물에 대하여 비슷한 관찰기간 내에 사망이 발생하는지에 대한 일반증상관찰을 실시한다. 시험진행 후기에 사망한 동물은 최종 사망동물로 처리하여 평가한다.

(6) 동물윤리

피부부식성이나 자극성으로 인해 동물에 심한 통증과 스트레스를 유발하는 물질은 투여할 필요가 없다. 빈사상태의 동물, 곧 사망하게 될 것으로 보이는 동물 또는 극심한 통증과 스트레스를 겪고 있는 동물들은 윤리적으로 안락사 시켜야 하며, 시험 중 사망한 동물과 같은 결과로 처리한다. 생존한 동물들이 더 사망하는 경우 및 모든 용량 수준이 LD₅₀을 초과하는 것으로 보이는 경우에는, 사망이 발생하는 투여량보다 두 단계 낮은 용량(관찰 기간 연장 포함)으로 시험을 재개하는 것이 바람직하다.

<그림> OECD 가이드라인에서 제공하는 AOT 425 StatPgm 전산프로그램 스크린 화면의 예

The screenshot displays the AOT425StatPgm software window. The title bar reads 'AOT425StatPgm'. The menu bar includes 'New Test', 'Load Data', 'Save Data', 'Get Report', 'Options', 'About AOT425', and 'Exit'. The main interface has a teal background. At the top, there are input fields for 'Test / Substance:' (containing 'Example of stopping criterion in Paragraph 33 (c) of OECD TG 425'), 'Test Type:' (set to 'Main'), and 'Limit Dose:' (set to '5000'). To the right, a box titled 'Assumed values at start of the main test:' shows 'LD50:' as 'Default' and 'Sigma:' as '0.5'. Below these is a table with 6 columns: 'Test Seq.', 'Animal ID', 'Dose mg/kg', 'Short-term Outcome', 'Long-term Outcome', and 'Program's Data Entry Messages'. The table contains 15 rows. Row 10 is highlighted in blue and contains the text 'Stop Dosing'. Below the table, a text box states: 'The main test is complete. Stopping criteria met: LR criterion. Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.'

Test Seq.	Animal ID	Dose mg/kg	Short-term Outcome	Long-term Outcome	Program's Data Entry Messages
1	1	175	0	0	
2	2	550	0	0	
3	3	1750	X	X	
4	4	550	0	0	
5	5	1750	X	X	
6	6	550	0	0	
7	7	1750	0	0	
8	8	5000	X	X	
9	9	1750	X	X	
10		Stop Dosing			
11					
12					
13					
14					
15					

The main test is complete.
 Stopping criteria met: LR criterion.
 Estimated LD50 = 1750 (The one dose with partial response). 95% PL Confidence interval is 651.9 to 2690.

3.4 관찰사항

- (1) 관찰기간은 일반적으로 14 일간 실시하는데 고정적이지는 않으며, 독성 반응, 발현시간, 회복기간 등에 따라 변경될 수 있다.
- (2) 관찰은 투여 후 30 분 이내에는 적어도 한번 관찰하고, 처음 24 시간동안 일정시간마다 관찰한다. 특히 투여 후 처음 4 시간은 특별한 주의를 기울여 관찰하도록 한다. 이후 14 일까지 적어도 매일 1 회 이상 관찰한다.
- (3) 윤리적으로 안락사 시킨 동물의 사망시간은 가능한 정확하게 기록되어야 한다.
- (4) 독성 증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하므로 모든 관찰은 체계적으로 기록되어야 하며, 개체별로 기록하여야 한다.
- (5) 동물에서 독성징후가 지속적으로 나타나는 경우, 추가적인 관찰이 필요하다. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡계, 순환계, 자율 및 중추신경계, 전신적 운동 활동 및 행동 유형을 포함한다. 특히 진전, 경련, 설사, 기면, 수면, 유연, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.
- (6) 체중은 시험물질 투여 직전과 종료 후 부검 직전에 측정하며, 시험기간 중에는 적어도 주 1 회 측정을 원칙으로 하는데 이때 체중 변화를 계산하여 반드시 기록하도록 한다.
- (7) 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 시험동물은 부검 후 소견을 개체별로 상세하게 기록한다. 시험물질 투여 후 24 시간 이상 생존한 동물에 대하여 필요시 부검 후 조직병리학적 관찰을 통한 소견을 기록한다.

4. 시험상의 유의사항

- 4.1 본 시험법은 시험물질 투여 후 빠른 시일 내에(1 일 ~ 2 일내) 사망하는 시험에 적합하며, 투여 후 사망기간이 비교적 긴(5 일 이상) 시험에는 적합하지 않다.
- 4.2 동물의 복지를 위하여, 2,000 mg/kg 이상의 한계시험(GHS category 5의 물질)에 대한 동물시험은 권장되지 않으며, 이 같은 시험을 실시하는 것이 인

간 또는 동물의 건강 및 환경의 보호와 직접적인 관계가 성립하는 경우에만, 실험을 실시하도록 한다.

III. 시험결과 및 보고

시험의 보고서에는 다음과 같은 정보가 반드시 포함되어야 한다.

5.1 시험기관의 명칭 및 소재지

5.2 시험책임자 및 담당자 성명

5.3 시험물질

물질명과 CAS 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리화학적 특성, 시험물질의 안정성 및 기타 정보

5.4 부형제

물 이외의 경우는 부형제의 사용 및 선택 이유

5.5 시험동물

시험동물의 종/계통 및 선택 이유, 동물 수, 성별(암컷 대신 수컷을 사용한 경우 그 이유), 연령, 공급원, 미생물 상태, 사육조건, 사료 등

5.6 시험조건

조제 시험물질의 물리적 형태 및 기타 구체적인 사항, 첫 투여량 및 공비의 설정 근거, 투여 시간, 투여액량, 사료 및 물의 품질

5.7 시험결과

(1) 체중 및 체중의 변화

(2) 개체별 독성반응 데이터

사망 및 빈사 동물수, 독성증상을 보이는 동물 수, 증상의 정도, 지속기간 등

(3) 독성증상을 보이는 시간 및 회복가능성 여부

(4) 부검 결과(조직 관찰시 조직병리학적 소견)

(5) LD₅₀ 산출 결과

(6) 통계처리 방법

(7) 결과의 고찰 및 해석

(8) 결론

제27항 생체의 피부 자극성시험 (인체피부모델시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 인체피부모델을 이용한 생체의(*In vitro*) 피부 자극성 시험으로서, 화학물질 또는 혼합물의 피부자극에 대한 영향을 평가하는 데 그 목적이 있다. 이 시험은 화학물질 또는 혼합물을 세계분류표시조화(UN GHS)의 분류법에 따라 자극성 물질과 비자극성 물질로 구분하는 데 필요한 정보를 제공한다.

* UN GHS; United nations globally harmonized system

2. 용어 정의

2.1. 피부 자극성(Skin irritation)

시험물질을 일정시간 동안 피부조직에 노출시켰을 때 비특이적 면역반응을 포함한 국소적 염증반응. 시험물질의 노출을 중단하였을 때 회복이 가능한 반응이며 주요 임상증상은 홍반, 부종, 가려움증 및 통증 등을 포함

2.2. 세포 생존율(Cell viability)

대조군의 생존 대비 시험물질 처리군의 생존 비율(%)

2.3. 반수치사시간(ET₅₀)

일정한 시험물질의 농도에서 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시간

2.4. 반수치사농도(IC₅₀)

일정한 시간동안 세포의 생존율을 50 % 감소시키는 데 필요한 시험물질의 농도

II. 시험

1. 원리

3 차원 인체피부모델에 시험물질을 적용하여, 특정 노출시간동안 세포의 생존율을 측정함으로써 자극성 화학물질을 확인할 수 있다. 피부 자극성 시험의 원리는 시험물질이 각질층을 통과하여 하층의 피부 조직에 가역적 세포손상을 유발하는 것이며 세포손상의 정도는 일반적으로 MTT법을 이용한 세포생존율로 측정한다. 손상된 인체피부모델의 세포는 주로 염증성물질 분비 등 일련의 염증반응을 나타낸다. 세포생존율이 50 % 이하일 경우 자극성물질로 간주하며 UN GHS Category 2로 분류한다. 세포생존율이 50 %를 초과할 경우 비자극성 물질로 간주하며 No Category로 분류한다.

2. 시험의 준비

2.1. 인체피부모델

(1) 종류

생체의 피부 자극성 시험을 수행하기 위해서는 인체피부모델을 사용한다. OECD에서 그 적정성이 검증된 모델로서 상업적으로 구입이 가능한 EpiSkin™, EpiDerm™, SkinEthic™, LabCyte EPI-MODEL24, epiCS® 및 Skin+®을 시험법에 사용하며, 이외의 인체피부모델을 사용하여 화학물질 등록 등 규제관리의 목적으로 피부자극성 시험결과를 생산하고자 할 때는 해당 인체피부모델에 대한 신뢰성, 정밀성, 제한점 등에 관한 품질보증 및 검증자료를 제출하여야 한다.

(2) 일반조건

일반적으로 인체피부모델을 제작하기 위해서는 비형질전(Non-transformed) 케라틴세포를 사용하여야 한다. 피부모델은 각질층(Stratum corneum) 아래에 다수의 표피 세포층(Basal layer, stratum spinosum, stratum granulosum)이 존재하여야 하며, 각질층은 필수지방층을 가진 여러 층으로 구성되어 세포독성 지표물질(SDS, Sodium Dodecyl Sulfate 또는 Triton X-100)의 침투를 방지하기 위해 견고한 기능적 장벽을 가진 구조라야 한다. 또한 미생물 등

(박테리아, 바이러스, 미코플라즈마, 곰팡이 등)에 의해 오염되지 않아야 한다.

(3) 기능조건

- 생존율 : 인체피부모델의 생존율은 MTT법으로 측정하며 이때 시험물질을 처리하지 않은 음성대조군에 대한 MTT법을 적용하였을 때 흡광도 최고치와 최저치에 대한 기준은 아래 표 1을 만족하여야 한다. 음성대조군의 세포 생존율은 시험물질 노출기간 동안 안정적으로 유지되어야 한다. MTT법에 사용되는 용매의 흡광도는 충분히 낮아서 세포생존율의 측정을 방해하지 않아야 하며 용매만의 흡광도(OD)는 0.1 미만이어야 한다.

표 1. 음성대조군에 대한 MTT법에서의 흡광도 범위

인체피부모델	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™(SM)	≥ 0.6	≤ 1.5
EpiDerm™SIT (EPI-200)	≥ 0.8	≤ 2.8
SkinEthic™ RHE	≥ 0.8	≤ 3.0
LabCyte EPI-MODEL 24 SIT	≥ 0.7	≤ 2.5
epiCS®	≥ 0.8	≤ 2.8
Skin+®	≥ 0.8	≤ 2.5

- 방어벽 기능 : 인체피부모델의 각질층은 세포독성 지표물질(SDS 또는 Triton X-100)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 충분히 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 이때 방어벽 기능의 정도는 IC₅₀ 이나 ET₅₀으로 나타낼 수 있는데 그 기준은 표 2와 같다.

표 2. 인체피부모델의 적정성 판단기준

인체피부모델	시험조건	최저값 기준	최고값 기준
EpiSkin™(SM)	SDS로 18 시간 처리	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.0 mg/mL
EpiDerm™SIT (EPI-200)	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 8.7 시간
SkinEthic™ RHE	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 10.0 시간
LabCyte EPI-MODEL 24 SIT	SDS로 18 시간 처리	IC ₅₀ = 1.4 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL
epiCS®	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 2.0 시간	ET ₅₀ = 5.0 시간
Skin+®	1 % Triton X-100 처리	ET ₅₀ = 4.0 시간	ET ₅₀ = 9.0 시간

- 재현성 및 숙련도 : 오랜 기간에 걸쳐 음성대조물질 및 양성대조물질에 대한 시험결과를 시험기관에서 재현성 있게 확인함으로써 시험기관의 숙련도를 입증하여야 한다. 음성대조물질(비자극성물질) 및 양성대조물질(자극성물질)의 목록은 표 3과 같다.

표 3. 인체피부모델의 기능 재현성 및 숙련도 확인을 위한 물질

UN GHS 분류	화학물질명 (CAS 번호)	생체내 시험등급 점수 ¹⁾
비자극성 물질 (No category)	Naphthalene acetic acid (86-87-3)	0
	Isopropanol (67-63-0)	0.3
	Methyl stearate (112-61-8)	1
	Heptyl butyrate (5870-93-9) (*optional Cat.3) ²⁾	1.7
	Hexyl salicylate (6259-76-3) (*optional Cat.3) ²⁾	2
자극성 물질 (Category 2)	Cyclamen aldehyde (103-95-7)	2.3
	1-bromohexane (111-25-1)	2.7
	Potassium hydroxide (5 % 수용액) (1310-58-3)	3
	1-methyl-3-phenyl-1-piperazine (5271-27-2)	3.3
	Heptanal (111-71-7)	3.4

¹⁾OECD TG 404에 따라 수행한 *In vivo* 시험결과임

²⁾Category 3의 분류는 ‘약한자극성물질’이며 UN GHS에 의한 분류에 따르면 비자극성물질에 해당함

- 품질관리(QC): 본 시험의 적정성 확보를 인체피부모델은 개발자 및 공급자가 제시하는 각 품질기준에 적합할 때에만 사용하여야 한다. 즉, 인체피부모델의 구조, 생존율 및 방어벽 기능 등이 품질기준에 적합하여야 한다. 품질기준은 IC₅₀ 및 ET₅₀로 판단하며 각 인체피부모델의 기준은 표 2에서 제시된 바와 같다.

3. 시험방법

3.1. 인체피부모델의 배양

인체피부모델의 배양은 모델 생산자 또는 공급자의 프로토콜에 따른다. 10 % 혈청 및 항생제를 포함하여 필요한 영양소가 적절히 함유된 배양배지를 사용하며, 피부모델에 따라 실온 또는 37 °C 및 5 % CO₂가 유지되는 세포 배양기에서 배양한다. 시험에 사용할 인체피부모델은 시험물질을 투여하기 전에 일정시간동안 해당 실험실의 세포 배양기에서 전배양하며 시험물질 노출이 종료된 후에는 42 시간 동안 후배양한다.

3.2. 시험물질 노출

시험물질은 액체 및 고체 모두 적용이 가능하며 각 노출시간에 대해 시험물질마다 최소 3 개의 인체피부모델을(n = 3) 사용한다. 각 시험마다 양성대조군과 음성대조군을 둔다. 시험물질의 적용방법은 인체피부모델에 따라 조금씩 차이가 있으며 표 4에 제시된 바와 같다. 시험물질은 인체피부모델에 적정 분량을 고르게 적용하며 적정범위 이상의 과량을 적용하지 않아야 한다. 고체물질을 적용할 경우 피부모델에 효과적으로 접촉할 수 있도록 탈이온수나 증류수를 피부 위에 도포해 준다. 필요한 경우, 고체는 시험 전에 분말로 분쇄하여 사용한다. 시험물질 노출이 종료되면 피부모델을 완충액이나 0.9 % NaCl로 세척한다. 세척 후에는 시험물질을 투여하지 않은 상태에

서 42 시간 동안 후배양하며 이는 세포가 시험물질에 의한 손상으로부터 회복되는 것을 평가하기 위한 것이다. 양성대조군은 5 % Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)를 사용하며 음성대조군은 물 또는 인산완충용액(PBS, Phosphate Buffered Saline)을 사용한다.

3.3. 생존율 측정

세포 생존율 측정은 유효성이 입증된 정량적 방법을 사용할 수 있다. 가장 널리 사용하는 방법은 MTT법이며 정확성 및 재현성이 입증된 다른 방법을 적용하는 것도 가능하다. MTT법은 시험물질 처리 및 후배양이 끝난 인체피부모델에 적절한 농도(예, 0.3 mg/mL ~ 1 mg/mL)의 MTT 용액에 넣고 3 시간 동안 CO₂ 세포 배양기에서 배양한 후, 침전된 청색의 포르마잔 산물을 이소프로판올 용매(Isopropanol)로 추출하고 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하거나, HPLC/UPLC-분광광도법을 이용한다. 시험물질이 MTT 등 발색제와 직접 작용하여 흡광도 측정에 영향을 줄 경우에는, 시험물질에 의한 방해 작용을 보정하기 위하여 추가적인 대조군을 사용한다. 세포생존율은 음성 대조군의 흡광도에 대한 시험물질 처리군의 흡광도의 백분율로 구한다.

표 4. 인체피부모델의 시험물질 노출 방법

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT(EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte EPI-MODEL24SIT	epiCS®	Skin+®
A) 전 배양						
배양 시간	18 시간 ~ 24 시간	18 시간 ~ 24 시간	≥ 2 시간	15 시간 ~ 30 시간	4 시간 또는 하룻밤	2 시간 또는 하룻밤
배지량	2 mL	0.9 mL	0.3 mL 또는 1 mL	0.5 mL	1 mL	1 mL
B) 화학물질 처리						
액체	10 µL (26 µL/cm²)	30 µL (47 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)	25 µL (83 µL/cm²)	30 µL (50 µL/cm²)	16 µL (32 µL/cm²)
고체	10 mg (26 mg/cm²) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm²) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm²) + DW (25 µL)	30 mg (50 mg/cm²) + DPBS (50 µL)	16 mg (32 mg/cm²) + DW (10 µL)
나일론 망 사용	사용하지 않음	필요 시 사용	사용	사용하지 않음	사용	사용
노출시간	15 분	60 분	42 분	15 분	20 분	42 분
배양온도	실온	a) 실온, 25 분 b) 37 °C, 35 분	실온	실온	실온	실온
C) 후배양						
배지량	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL	1 mL	2 mL
D) 시험결과적 적정성 - 동일시험에 사용된 인체피부모델간의 결과 값에 대한 표준편차로 판단						
음성대조군 조직 평균 OD (물 또는 DPBS)	≥ 0.6 및 ≤ 1.5	≥ 0.8 및 ≤ 2.8	≥ 0.8 및 ≤ 3	≥ 0.7 및 ≤ 2.5	≥ 0.8 및 ≤ 2.8	≥ 0.8 및 ≤ 2.5
양성대조군 조직 평균 생존율 (음성대조군의 %로 표현)	< 40 %	< 20 %	< 40 %	< 40 %	< 20 %	< 40 %
표준편차 (SD)	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18	≤ 18

DW : 증류수, DPBS : Dulbecco' s PBS

3.4. 판정

(1) 시험의 적정성

음성대조군의 흡광도 범위는 표 1의 기준에 적합해야 하며 각 인체피부모델의 적정성은 표. 2를 만족해야 한다. 양성대조군으로서 5 % SDS를 처리한 경우에는 자극성이 확인되어야 하며 각 동일조건으로 시험물질이 노출된 피부모델간의 표준편차가 표 4에 기술된 적정 범위 안에 존재하여야 한다.

(2) 판정기준

자극성 및 비자극성에 대한 판정은 각 인체피부모델에 대한 시험으로부터 산출된 세포생존율에 따라 표 5의 판정기준을 따른다.

표 5. 인체피부모델에 대한 자극성 및 비자극성 판정기준

판정	생존율
자극성 (UN GHS; Category 2)	50 % 이하일 때 (≤ 50 %)
비자극성 (UN GHS; No Category)	50 % 보다 클 때 (> 50 %)

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험물질의 자극성 및 비자극성을 평가하기 위해 시험군, 음성 및 양성 대조군의 결과를 인체피부모델에 따라 각각의 개별값 및 평균값으로 표에 요약하여 나타낸다(생존율 자료는 평균 \pm 표준편차로 나타낸다). 시험에 사용한 인체피부모델의 종류에 따라 시험을 수행하고 얻은 세포생존율 결과값을 바탕으로 표 5의 판단기준을 적용하여 자극성 및 비자극성물질을 판정한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 시험 및 대조 물질 정보

- (1) 단일조성물질: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드와 같은 화학물질 식별, 구조식, 순도, 불순물의 확인(가능한 수준에서)
- (2) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물: 성분의 화학적 동일성, 함량 및 관련있는 물리·화학적 성질
- (3) 물리적인 성상, 수용해도 그리고 추가적인 관련있는 물리·화학적 성질
- (4) 가능한 경우 출처, 로트번호
- (5) 시험 이전에 시험/대조 물질의 처리(필요한 경우 : 예, 가온 또는 분쇄 등)
- (6) 시험물질의 안정성, 사용 제한 날짜, 혹은 가능한 경우 재분석일
- (7) 보관조건

2.4. 시험조건

- (1) 사용한 인체피부모델(배치번호 포함)
- (2) 세포 생존율을 확인하기 위해 사용한 장비(예, Spectrophotometer)에 대한 보정정보, 파장 및 대역, MTT 포르마잔 정량화에 사용되는 MTT 포르마잔 정량화 방법
- (3) HPLC / UPLC-분광광도계 시스템 측정한계(해당되는 경우), 사용한 피부 모델에 대한 유효성을 포함한 모든 정보
 - 생존율, 방어벽 기능, 형태, 품질보증(QC) 자료
- (4) 모델의 과거 자료를 참조하여 배치자료와 관련하여 품질보증 자료의 수용 가능성이 포함되나 그에 제한되지 않음
- (5) 숙련도물질을 시험하여 사용 전에 시험방법 수행능력 입증

2.5. 시험의 절차

- (1) 사용한 시험결과에 대한 세부사항(노출 후 세척정보 포함)사용된 시험물질 및 대조물질 용량
- (2) 노출시간 및 온도
- (3) MTT - 환원제 착색 시험물질에 사용되는 대조군(해당되는 경우)
- (4) 노출시간당, 시험물질 및 대조군 당 사용된 인공피부모델 수
- (5) 사용된 인체피부모델 결정기준 / 예측 모델에 대한 설명
- (6) 시험절차 변경시 세부사항(있는 경우)

2.6. 시험 및 시험 성립조건

- (1) 과거 참고자료를 기반으로 양성대조군 및 음성대조군의 평균 및 허용기준, 양성대조군 및 음성대조군에 대한 조직 간의 허용되는 변동성
- (2) 시험물질에 대한 조직 간의 허용되는 변동성

2.7. 시험의 결과

- (1) OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, 조직 생존율 백분율, 평균 조직 생존율, 조직 간의 차이값 및 SD를 포함하는 각 측정에 대한 조직 개별 시험 샘플에 대한 자료표
- (2) MTT반응을 간접하는 시험물질의 경우 OD 또는 MTT 포르마잔 피크 면적, SD에 대한 대조 시험(해당되는 경우)
- (3) 실행 및 허용 기준과 관련하여 시험물질 및 대조군물질 결과
- (4) 시험지침에서 제시되어 있지 않은 다른 반응에 대한 설명
- (5) 시험결과에 대한 판정

2.8. 결과에 대한 고찰

2.9. 결론

제28항 유전독성시험 (생체의 포유류세포 유전자 돌연변이시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 생체의 시험으로서 포유류세포의 유전자에 이상을 유발하는 화학물질을 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 전향 돌연변이(Forward mutation)

야생형(wild type) 유전자에 변이를 일으킴으로써 전사 단백질의 활성 또는 기능을 상실 또는 변화시키는 돌연변이

2.2 염기쌍 치환 돌연변이원(Base pair substitution mutagen)

DNA에서 한 쌍 혹은 여러 염기쌍의 치환을 유발하는 물질

2.3 해독틀 돌연변이원(Frameshift mutagen)

유전자 배열에 한 개 또는 그 이상의 염기가 삽입되거나 결실됨으로써 해독틀(reading frame)의 변화를 유발하는 물질

2.4 돌연변이 빈도(Mutant frequency)

측정된 돌연변이 세포 수를 살아있는 세포 수로 나눈 것

2.5 클로닝 효율(CE, cloning efficiency)

배양접시에 저밀도로 분주된 세포 수 대비 계수 가능한 콜로니의 생성비율

2.6 상대 생존율(RS, relative survival)

음성 대조군에서의 클로닝 효율 대비 시험물질 처리군의 클로닝 효율

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 생체외(*in vitro*) 시험법으로서 필요에 따라 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용한다. 그러나 외인성 대사활성계를 시험에 사용하여도 생체내(*in vivo*) 대사활성계를 완전히 구현하는 것은 아니므로 시험결과를 해석할 때는 이를 감안하여야 한다. pH 또는 삼투압의 변화, 배지 성분과의 상호작용 및 세포독성 등 과도한 시험 조건으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있으므로 이러한 조건은 피하도록 한다.

2. 원리

포유류 배양세포를 시험물질에 노출시킨 다음 생체외(*in vitro*) 시험조건에서 DNA 수준에서의 변화에 따른 돌연변이 여부를 측정한다. Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase gene(Hprt) 효소 또는 xanthine-guanine phosphoribosyl transferase transgene(Xprt) 효소의 결핍 세포를 이용한 시험법으로 각각 HPRT 시험법과 XPRT 시험법으로 부른다. 이들 세포는 정상세포와 달리 세포독성을 가진 6-thioguanine(TG)을 유전자 합성에 사용하지 않으며 따라서 세포독성이 나타나지 않는다. 시험물질에 의해 위의 효소에 돌연변이가 나타날 경우에는 6-TG가 유전자 합성에 사용되어 세포독성이 나타나므로 배양세포의 성장 정도를 측정하여 돌연변이 빈도를 계산한다.

3. 시험의 준비

3.1 시험 세포

일반적으로 HPRT 시험에는 CHO, CHL, V79, L5178Y, TK6 세포주를 사용하고, XPRT 시험에는 AS52 세포주를 사용한다. 세포는 마이코플라스마(mycoplasma)에 오염되지 않았는지 확인해야 하며, 만일 오염되었다면 시험에 사용할 수 없다.

3.2 배지 및 배양 조건

시험 세포에 따라 적절한 배지와 배양조건(배양용기, 온도, 이산화탄소 농도, 습도 등)을 사용한다. 배지는 시험의 형태와 세포의 종류에 따라 선택적으로 사용한다. 배양조건은 세포의 생장률이 최적상태가 되도록 하며, 돌연변이 또는 비돌연변이 세포들이 콜로니를 형성하는 데 적합하여야 한다.

3.3 배양 준비

세포는 보관 세포주로부터 배양하여 과밀하게 자라지 않고 기하급수적으로 자랄 수 있도록 유지한다.

3.4 대사활성(metabolic activation)

내인성 대사능력이 부족한 세포에는 외인성 대사활성제(S9 mix)를 사용한다. 대사활성제는 효소유도 물질(aroclor 1254, phenobarbital과 β -naphthoflavone의 혼합물질)을 처리한 설치류의 간에서 분리한 S9 분획을 사용한다. S9 분획은 1 % ~ 2 %(v/v)를 사용하고, 최종 시험 배지 내에 10 %(v/v)까지 증가할 수 있다.

3.5 시험물질의 조제

고체의 시험물질은 용매 혹은 용제에 용해시키거나 현탁액으로 만들어 사용하며, 세포에 처리하기 전에 적절하게 희석시킨다. 액체의 시험물질은 직접 처리 또는 희석하여 세포에 처리한다. 가스 혹은 증기 시험물질은 봉입된 배양관 내의 처리와 같이 적절한 변형시킨 방법을 사용한다. 시험물질의 안정성 자료가 없는 경우에는 시험 직전에 시험물질을 조제한다.

3.6 시험조건

3.6.1 용매

용매는 시험에 영향을 주지 않으면서 시험물질의 용해도를 최적화하는 것으로 선택한다. 가능한 수용성 용매를 사용하며 최종 시험 배지의 10 %(v/v)를 넘지 않아야 한다. 유기용매의 경우는 1 %(v/v)를 넘지 않아야 한다.

다. 잘 알려진 용매나 매개물질 외에 다른 것을 사용할 경우, 시험에 사용 가능하도록 적절한 시험자료를 제시하여야 한다.

3.6.2 세포독성 측정과 노출농도 선정

시험물질의 최고농도는 세포독성, 용해도, pH 및 삼투압 농도의 변화 등을 고려하여 결정한다. 투여군은 최소한 4 개 이상의 농도를 설정한다. 투여군의 농도 범위는 세포의 치사율이 나타나는 독성발현 농도로부터 독성이 나타나지 않는 농도까지 포함되도록 설정한다. 세포독성에 근거하여 최고농도는 상대 생존율(RS)이 10 % ~ 20 % 정도가 되는 것이 바람직하다. 세포독성이 거의 없는 시험물질의 경우에는 최고 농도가 10 mM, 2 mg/mL 또는 2 µL/mL 중 가장 낮은 것으로 하고, 불특정 혼합물질에서는 5 mg/mL로 할 수 있다.

3.7 대조군

음성대조군은 용매만을 처리한 것이며, 양성대조군과 함께 모든 시험 조건에 포함한다. 대사활성계의 유·무에 따른 양성대조군을 두며, 대표적인 양성대조물질은 아래 표 1과 같다.

표 1. 대표적인 양성 대조물질

대사활성 조건	위치	화학물질(CAS 번호)
외인성 대사활성이 존재하지 않는 경우	<i>Hprt</i>	Ethylmethanesulfonate(62-50-0) Ethylnitrosourea(759-73-9) 4-Nitroquinoline 1-oxide(56-57-5)
〃	<i>Xprt</i>	Streptonigrin(3930-19-6) Mitomycin C(50-07-7)
외인성 대사활성이 존재하는 경우	<i>Hprt</i>	3-Methylcholanthrene(56-49-5) 7,12-Dimethylbenzanthracene(57-97-6) Benzo(a)pyrene(50-32-8)
〃	<i>Xprt</i>	Benzo(a)pyrene(50-32-8)

4. 시험방법

4.1 시험물질의 처리

대사활성계의 유·무에 따라 시험물질을 처리하고, 보통 3 시간 ~ 6 시간 노출시킨다. 시험의 모든 단계에서 배양 중에 자연적으로 유발되는 돌연변이가 10 개가 유지될 수 있도록 세포를 적절히 계대 혹은 처치한다. 일반적으로 돌연변이 빈도는 $5 \times 10^{-6} \sim 20 \times 10^{-6}$ 이다.

4.2 표현형 발현 시간 및 돌연변이 빈도 측정

시험물질의 처리 후, 돌연변이 표현형이 발현될 수 있도록 최소 7 일 ~ 9 일간 배양한다. 그 동안, 세포는 규칙적으로 계대배양한다. 표현형 발현 후에는 6-thioguanine을 첨가한 배지와 그렇지 않는 배지에 세포를 다시 분주하고 콜로니 성장에 필요한 7 일 ~ 12 일 동안 배양한 후 돌연변이의 수와 클로닝 효율을 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

1.1 결과의 처리

시험결과는 대조군 및 처리군 모두에서 세포독성, 상대 생존율(RS), 돌연변이 빈도(MF)를 계산한다. 계산 방법은 다음과 같다. 시험결과는 표로 정리한다.

(1) 클로닝 효율(CE) = 콜로니 수 / 배양 접시에 분주한 세포 수

(2) 상대 생존율(RS) = (시험물질 투여군의 보정된 CE / 용매 대조군의 보정된 CE) \times 100 %

(3) 돌연변이 빈도(MF) = 6-thioguanine이 첨가된 배지에서의 돌연변이 콜로니의 CE / 6-thioguanine이 첨가되지 않은 배지에서의 CE

1.2 결과의 평가

어느 한 농도에서 음성대조군과 비교하여 유의적인 증가를 보이거나 농도 의존적인 증가를 보이거나, 결과 값이 음성대조군의 범위를 넘으면 양성으

로 판단한다. 음성대조군과 비교하여 어느 농도에서도 유의적인 증가가 나타나지 않고, 농도 관련 증가가 없으며, 모든 결과 값이 음성대조군의 범위 내에 있으면 음성으로 판단한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음과 같은 정보를 포함하도록 한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명, 소속

2.3 시험물질

- (1) 공급처, 로트 번호, 사용기한
- (2) 화학적 동정(CAS 번호) 및 물리화학적 성질
- (3) 시험물질의 안정성, 용해도

2.4 용매

- (1) 용매 선정근거
- (2) 최종 배양 배지 내 용매의 백분율

2.5 세포

- (1) 세포 명, 형태 및 공급원
- (2) 계대배양 수(가능하다면 계대 이력)
- (3) 핵형 특성 및 염색체의 수
- (4) 세포 배양 방법 및 세포의 배가시간(doubling time)
- (5) 마이코플라스마의 부재

2.6 시험조건

- (1) 시험농도, 배양 수 등의 설정에 대한 근거
- (2) 배지조성 및 이산화탄소, 습도 농도
- (3) 최종 시험물질 농도, 배지 내의 용매 농도
- (4) 배양 시간 및 온도
- (5) 시험물질의 처치 기간, 처치 기간 중의 세포 밀도, 발현 기간
- (6) 대사활성계의 형태 및 구성
- (7) 양성대조군 및 음성대조군과 각각의 최종 농도
- (8) 선택물질과 농도
- (9) 시험의 성립조건
- (10) 생존 세포 및 돌연변이 세포 수의 계산 방법, 세포독성 측정방법 및 관련 정보
- (11) pH, 삼투압, 침전 측정에 사용된 방법
- (12) 판정 기준

2.7 시험결과

- (1) 시험물질을 처치한 세포 수와 계대배양된 세포 수
- (2) 세포독성 측정과 다른 관찰 결과
- (3) 침전 여부 및 측정 시간
- (4) 선택 및 비선택 배지 내의 세포 수, 비선택 배지에서의 콜로니 수, 선택 배지에서의 저항성 콜로니 수, 돌연변이 빈도
- (5) 용량-반응 관계(가능한 경우)
- (6) 음성 대조군 및 양성 대조군 결과
- (7) 통계적 분석 및 p-value

2.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제29항 유전독성시험 (설치류 우성치사시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류 우성 치사를 평가하여 생식세포의 염색체 이상으로 돌연변이를 일으켜 발달 초기 조직에 유전독성을 유발하는 물질을 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 우성 치사 돌연변이(Dominant lethal mutation)

생식세포의 기능장애를 일으키지는 않으나, 수정란 또는 발달 중인 배아에 치명적인 돌연변이

II. 시험

1. 원리

우성치사(DL, dominant lethal) 돌연변이는 배아 또는 태아를 사망에 이르게 한다. 우성치사는 일반적으로 염색체 이상(구조적 및 수치적 이상)의 결과로 배아 또는 태아가 사망하는 것으로 간주하지만, 유전자 돌연변이 및 독성 영향이 반영될 수도 있다.

수컷 동물을 시험물질에 노출시킨 후 시험물질에 노출되지 않은 암컷과 교배한다. 순차적 교배 간격을 이용하여 다양한 생식세포 단계를 별도로 시험할 수 있다. 적절한 기간 이후에 암컷을 부검하여, 착상 수 및 살아있거나 죽은 배아의 수를 결정하기 위해 자궁 내용물을 검사한다. 우성치사는 시험군과 대조군 내 암컷 당 살아있는 착상 수를 비교하여 계산한다. 대조군 내 암컷 당 죽은 착상 수보다 시험군 내 암컷 당 죽은 착상 수가 증가한 것은 시험물질에 의한 착상 후 사망을 나타낸다. 대조군과 시험군에서 죽은 착상 대 전체 착상의 비율을 구하고 서로 비교한다. 착상 전 유산은 황체 수를 바탕으로 하거나 시험군 및 대조군 내 암컷 당 전체 착상을 비교해서 추정할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

건강하고 성적으로 성숙한 마우스를 주로 사용하고, 랫드도 가능하다. 각 시험동물은 개별 표시하고 최소 5 일간 순화시킨다. 실험동물 각 성별의 평균 체중의 20 %가 넘는 동물은 사용하지 않는다.

2.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 개별 동물별로 사육하거나, 같은 성별의 작은 군 단위별로 나누어 사육한다. 인공조명을 사용할 경우 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넬리 쓰는 것을 사용하되, 사료에 시험물질을 섞어 노출하는 경우에는 사료와의 혼합이 적절한 것을 선택한다. 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 한다.

2.3 시험물질의 조제

고체 시험물질은 적절한 용매나 용제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 액체 시험물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 흡입 노출의 경우에는 시험물질의 물리화학적 성질에 따라 가스, 증기, 또는 고체/액체 에어로졸을 사용할 수 있다. 조제물의 경우, 안정성 자료가 확보되지 않을 때에는 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매

용매는 투여한 농도에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 한다. 수용성인 용매의 사용을 우선적으로 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적정성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다.

2.5 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성대조군과 음성대조군(용매 또는 용제)을 포함하여야 한다. 양성대조군으로 사용할 수 있는 물질과 그 용량의 예는 아래의 표와 같다. 음성대조군은 시험군과 동일 방법으로 용매만을 처리하고, 우성치사 또는 유해작용이 나타나지 않아야 한다.

표 1. 양성 대조물질의 예

화학물질(CAS 번호)	효과적 용량 범위 (mg/kg)(설치류)	투여 시간(일)
Triethylenemelamine(51-18-3)	0.25(마우스)	1
Cyclophosphamide(50-18-0)	50 ~ 150(마우스)	5
Cyclophosphamide(50-18-0)	25 ~ 100(랫드)	1
Ethyl methanesulphonate(62-50-0)	100 ~ 300(마우스)	5
Monomeric acrylamide(79-06-1)	50(마우스)	5
Chlorambucil(305-03-3)	25(마우스)	1

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 결정시험을 수행하여 최대내성용량(MTD, maximum tolerated dose)를 구한다. 시험물질의 용량단계는 3 단계의 용량으로 설정한다. 투여량은 독성이 나타나는 최소용량부터 무독성을 나타내는 용량범위를 포함하도록 한다. 시험물질의 독성이 없는 경우에는, 단회투여의 경우 최고용량은 최대 2,000 mg/kg으로 하고 독성이 있는 경우에는 최대내성용량을 최고용량으로 한다. 한계용량은 14 일 이상의 반복 투여에서는 1,000 mg/kg/day로 하고, 14 일 미만의 반복 투여에서는 2,000 mg/kg/day로 한다.

3.2 시험 기간과 시험동물의 교배 간격

모든 개별 수컷을 적절한 간격으로 임신한 경험이 없는 암컷과 순차적으로

교배시킨다. 최소한 1 회 발정기 기간 동안 암컷과 수컷을 함께 두어야 한다. 대안으로, 정액이 질 속에 존재하거나 질전이 발견되어 교배가 발생했다고 확인될 때까지 교배시킨다. 단회 또는 5 회 연속 투여의 경우, 최종 투여 후 마우스는 8 번, 랫드는 10 번 교배하도록 한다. 반복 투여의 경우 투여 기간의 증가와 비례하여 교배 간격의 수가 줄어들 수 있으나, 모든 정자형성 과정을 반영하도록 한다.

3.3 시험물질의 투여

인체 노출 경로를 고려하여 사료나 음용수에 혼합하여 투여하거나 피하, 정맥, 경구, 국소, 흡입 노출이 가능하다. 복강 내 투여는 일반적으로 권장하지 않는다. 사료 또는 음용수에 혼합하여 단회 투여할 경우에는 사료나 음용수의 섭취시간을 충분히 고려한다. 경구 투여 시의 용액의 최대 부피는 시험동물의 크기에 따른다. 시험물질은 마우스 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않도록 하되, 수용액인 경우 2 mL까지 투여할 수 있다.

3.4 일반증상관찰

시험동물의 일반증상관찰은 1 일 1 회, 가능한 동일 시간에 관찰한다. 최소 하루 2 번 이환율과 사망률을 관찰한다. 시험 시작 시점과 종료 시점에 모든 동물의 체중을 측정하고, 반복 투여 시는 최소한 일주일에 1 회 측정한다. 주 단위의 연구에서는 사료 섭취량을 일주일 단위로 측정하고, 음용수로 시험물질을 투여할 경우에는 음용수 섭취량을 측정한다. 치사량이 아니더라도 시험동물에서 심한 독성이 나타날 경우에는 시험 종료 전에 안락사시킨다.

3.5 조직표본제작

마우스는 임신 13 일, 랫드의 경우는 임신 14 일 ~ 15 일에 치사시키고, 자궁 내에 착상 수, 살아있는 배아 수, 죽은 배아 수, 황체를 측정한다. 황체 측정을 위해 자궁각과 난소를 노출시키고, 태아의 수 및 체중을 측정한다.

다. 유산된 경우를 주의 깊게 확인하고 태아 사망률을 기록한다. 임신한 암컷의 수, 총 착상 수, 착상 전 유산 수, 착상 후 사망 수를 기록한다. 태아는 최소 2 주 동안 bouin 고정액에 두고 외부의 최기형성을 관찰하여, 생식 및 발생 독성의 부가적인 정보를 얻는다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

다음 데이터는 도표 형식으로 제시한다.

- 수컷의 수
 - 임신한 암컷의 수 및 임신하지 않은 암컷의 수
 - 각 수컷 및 암컷의 ID를 포함한 교배의 결과
 - 교배 간격
 - 수컷에 대한 투여 용량 수준
 - 각 암컷 별 살아있는 착상 및 죽은 착상의 수
- 위의 자료는 적절한 통계분석법에 의해 평가한다.

2. 결과의 평가

어느 한 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의적으로 증가하거나, 시험조건 하에서 용량 관련 증가가 보이거나, 음성대조군의 허용 범위를 넘었을 때 양성으로 판단한다. 음성대조군과 비교하여 어느 용량에서도 유의적인 증가가 없고, 용량 관련이 없으면 음성으로 판단한다. 적절한 통계 프로그램을 사용하여 시험물질의 우성 치사 돌연변이 유발 여부를 판단한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

- (1) 식별 자료 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 물리화학적 성질

3.4 시험물질의 준비

- (1) 용매 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성.
- (3) 노출 방법에 따른 시험물질 조제 및 분석

3.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통 및 선정근거
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 표시 방법
- (5) 동물의 체중범위, 단기 시험의 경우는 시험 개시 및 종료할 때 동물의 개별 체중, 일주일 이상의 시험의 경우는 시험 기간 중 개별 체중 및 사료 섭취량, 각 군별 평균 및 표준 편차
- (6) 대조군과 처리군에서 교배된 부모 개체의 수(암컷 및 수컷)

3.6 시험조건

- (1) 음성(용매/보조제) 및 양성대조군 설정 조건
- (2) 용량범위설정시험 자료 및 투여용량 선정근거
- (3) 투여 경로 선정 근거 및 투여방법
- (4) 시험 물질 준비 및 투여의 세부사항
- (5) 사료 및 음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량(mg/kg 체중/일)으로 환산
- (6) 사료 및 음용수 성적서

- (7) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점
- (8) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (9) 교배 일정 및 교배 확인 방법
- (10) 우성 치사 판단 기준

3.7 결과

- (1) 독성증상
- (2) 교배 및 처치 중 수컷의 체중
- (3) 교배 암컷 수
- (4) 용량반응관계
- (5) 음성 대조군 및 양성 대조군의 자료
- (6) 표로 정리된 결과 값, 우성치사 빈도를 포함한 요약된 결과 자료
- (7) 통계분석법

3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제30항 유전독성시험 (포유류 골수세포를 이용하는 염색체이상시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 설치류와 같은 동물의 골수세포에서 시험물질에 의해 유도된 구조적 염색체 이상을 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 이수성(Aneuploidy)

염색체의 전체 집합의 배수는 아니며, 하나 또는 그 이상의 염색체에 의해 발생한 정상 2 배체(또는 반수체)로부터의 이탈

2.2 중심립(Centromere)

세포분열 중에 방추사가 결합되어 딸 염색체가 딸세포의 극으로 순차적으로 이동하는 것을 가능하게 하는 염색체의 영역

2.3 염색 분체형 이상(Chromatid-type aberration)

단일 염색분체의 파손이나 염색분체간의 파손과 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.4 염색체형 이상(Chromosome-type aberration)

동일한 부위에서 양 염색분체의 파손 또는 재결합으로 표현되는 구조적 염색체 손상

2.5 내재복제(Endoreduplication)

DNA 복제의 S기가 끝난 후에, 핵이 유사분열을 하지 않고 또 다른 S기를 시작하여 4 개, 8 개, 16 개 등 2^n 개의 염색 분체를 가진 염색체가 만들어지는 현상

2.6 갭(Gap)

한 개 염색분체의 폭보다 더 작고, 염색 분체의 정렬 불량이 최소인 비염색 손상부위

2.7 유사분열지수(MI, mitotic index)

세포 집단에서 관찰되는 모든 세포 수에 대한 유사분열 중기에 있는 세포 수의 비율

2.8 배수성(Polyploidy)

염색체 세트 중 낱개 염색체의 수치 변화와는 반대로, 모든 염색체 세트 수의 변화를 수반하는 수치적 염색체 이상

2.9 염색체 구조적 이상

세포분열 중기에 현미경으로 관찰되는 염색체의 구조적 변화(결실, 절편, 교환 등)

II. 시험

1. 원리

골수 세포의 염색체 이상을 분석하여, 포유류의 생체 내 염색체 이상 유발 가능성을 평가한다. 구조적 염색체 이상은 염색체 이상 혹은 염색분체 이상의 2 가지 유형으로 나타난다. 실험동물에 적절한 노출 경로로 시험물질을 노출시키고, 적정 시간 후에 분열중기 정지물질을 처리한 후에 인도적으로 치사시킨다. 골수 세포로부터 염색체 표본을 만들고 염색한 후, 분열 중기 세포에서 염색체 이상을 분석한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

주로 랫드를 사용한다. 건강한 젊은 성숙 개체로 6 주령 ~ 10 주령을 사용

한다. 시험을 시작할 당시에 시험동물의 체중 차이는 가능한 적어야 하며 평균 체중의 20 %가 넘는 동물은 사용하지 않는다. 암·수 사이에 독성에 대한 감수성 차가 없다고 판단되는 경우에는 한 가지 성별로 시험한다. 성별의 차이가 있다면 암·수 모두 사용한다. 동물 수는 성별에 따라 시험군 당 최소 5 마리 이상을 사용하고 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다. 각 동물의 식별을 쉽게 할 수 있도록 개개의 동물에 표시를 한다.

2.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 40 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 개별적으로 사육하거나 또는 같은 성별의 작은 군 단위별로 사육한다. 인공 조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 한다.

2.3 시험물질의 조제

고체 시험물질은 적절한 용매를 이용하여 용해 또는 현탁시켜 사용하며, 액체 시험물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 흡입 노출은 시험물질의 물리·화학적 성질에 따라 가스, 증기 또는 고체/액체 에어로졸 형태로 사용한다. 시험물질의 안정성 자료가 확보되지 않을 경우에는 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매

용매는 투여한 용량에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 한다. 수용성인 용매의 사용을 우선적으로 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매 이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적정성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다.

2.5 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성(용매) 대조군을 포함하여야 한다. 양성 대조군은 구조적 염색체 이상을 유발하는 것으로 잘 알려진 물질로서

아래 표 1과 같다. 음성 대조군은 시험군과 동일 방법으로 용매 또는 용제만을 처리하고, 염색체 이상이 없는 것을 보여주도록 한다.

표 1 포유류 골수세포를 이용하는 염색체이상시험의 양성 대조물질

화학물질	CAS 번호
Ethyl methanesulphonate	62-50-0
Methyl methanesulphonate	66-27-3
Ethyl nitrosourea	759-73-9
Mitomycin C	50-07-7
Cyclophosphamide(monohydrate)	50-18-0(6055-19-2)
Triethylenemelamine	51-18-3

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험용량을 선정하기 위한 용량 설정 예비시험을 수행할 수 있다. 골수 독성의 징후를 나타내지만 사망이나 심각한 고통은 나타나지 않는 최대내성용량(MTD, maximum tolerated dose)을 최고투여량으로 하며, 최소한 3 단계의 용량 단계(공비 2 ~ 4)를 포함한다. 만약 시험물질이 독성을 나타내지 않을 경우, 1 회 최고용량은 2,000 mg/kg로 한다.

3.2 한계시험

투여기간이 14 일 이상이면 1,000 mg/kg/day로, 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day로 한계용량을 설정한 후, 한계용량에서 독성이 나타나지 않고 구조상 유사한 물질의 유전독성 시험결과를 토대로 하여 유전독성이 없다고 예상된다면 전체 용량에 대한 시험을 수행할 필요는 없으며, 한계용량만으로 시험을 실시할 수 있다.

3.3 시험물질의 투여

인체 노출경로를 고려하여, 사료나 음용수에 혼합하여 투여하거나, 피하,

정맥, 경구, 흡입 또는 기관지 경로를 통한 투여가 가능하다. 복강 내 투여는 일반적으로 권장하지 않는다. 사료 또는 음용수에 혼합하여 단회 투여할 경우에는 사료나 음용수의 섭취시간을 충분히 고려한다. 경구 투여 시의 용액의 최대 부피는 시험동물의 크기에 따른다. 시험물질은 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않도록 하되, 수용액인 경우 2 mL까지 투여할 수 있다.

3.4 투여일정 및 표본채취

- (1) 시험물질은 보통 단회 투여하나, 하루에 2 시간 ~ 3 시간 이내로 나누어 2 회 이상 분할 투여가 가능하다. 표본 채취는 최종 투여 혹은 흡입 노출 기간에 따라 시간을 정한다. 반복투여에 대한 적절한 자료가 거의 없으나, 독성 용량에서 일어날 수 있는 염색체 손상 유사분열 세포의 손실을 피하도록 주의하여야 한다.
- (2) 골수 표본은 단회 처리 후 2 회 추출한다. 설치류에서, 첫 번째 표본 채취 간격은 일반 세포 주기의 1.5 배 시점에 수행한다. 두 번째 채취는 보통 첫 번째 표본 채취 24 시간 후 권장된다. 최고 투여량군에서는 처리 후 2 회의 표본 추출을 이용한다. 이외의 투여량의 경우는 첫 번째 표본 채취만을 수행한다. 하루 이상의 투여 방법이 사용될 경우, 마지막 처리로부터 세포 주기 1.5 배 시점 후에 표본을 채취한다.
- (3) 골수 표본을 추출하기 2 시간 ~ 5 시간 전에 분열중기 정지물질(예, colcemid 또는 colchicine)의 적절한 투여량을 복강 내로 주사한다. 골수에서 세포를 모아 염색체 이상을 분석한다.

3.5 동물의 관찰사항

하루에 1 회 이상 가능한 동일 시간에 시험동물의 일반적인 증상을 관찰, 기록한다. 투여 기간 동안 모든 동물의 이환율과 사망률을 최소 하루에 2 회 조사한다. 연구시작 당시에, 반복투여 시험 동안 최소 주 1 회, 그리고 안락사 시에 동물의 체중을 측정한다. 사료 및 음용수 섭취량을 측정한다. 치사량이 아니더라도 실험동물에게 심한 독성이 나타나면 시험 종료 전에

안락사 시킨다.

3.6 표본 제작

- (1) 시험물질이 골수에 노출로 인해 발생했다는 것을 증명하기 위한 목적으로 혈중농도를 측정하기 위해서는 적절한 시간에 혈액 표본을 채취한다.
- (2) 안락사 후 즉시 동물의 대퇴골 또는 경골에서 골수세포를 얻고, 저장성 용액에 노출시키고 고정한다. 중기세포를 슬라이드에 도말하고 염색한다.

3.7 분석

분석에 앞서 모든 슬라이드를 독자적으로 암호화한다. 유사분열 지수는 모든 처리된 동물(양성 대조군 포함), 용매 음성대조군 동물에 대해서 적어도 동물 당 1,000 개 세포에서의 세포독성의 측정으로 구한다. 갭(gap)을 포함하거나 배제한 구조적 염색체 이상에 대해서 각각의 동물에서 적어도 200 개의 중기세포들을 분석한다. 염색분체형 및 염색체형 이상은 별도로 기록하고, 절단, 교환 등의 아형(sub-type)으로 분류한다. 슬라이드 제작 중 종종 염색체가 손실되거나 중기의 부분적 파괴가 나타날 수 있으므로, 계수된 세포들은 $2n \pm 2$ 이상의 중심립(centromere)을 포함해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

유사분열 지수, 계수된 중기 세포 수, 중기 세포 당 염색체 이상이 존재하는 세포의 수 및 구조적 염색체 이상이 있는 세포의 백분율을 동물마다 평가하고 표로 제시한다. 구조적 염색체 이상은 그 유형에 따라 수와 빈도를 목록으로 제시한다. 배수성 세포와 내재복제된 염색체를 가진 세포 및 갭(gap)도 별도로 기록한다. 일반적으로, 갭(gap)의 빈도는 전체 구조적 이상 빈도의 분석에 포함하지 않는다. 동물 독성과 일반증상관찰 사항에 관한 자료 또한 기록한다.

2. 시험의 성립 조건

다음의 시험 성립조건에 따라 적절히 수행되었는지 판단한다.

- (1) 동시 수행된 음성대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합
- (2) 동시 수행된 양성대조군 자료가 기존 대조군 자료에 부합하고, 음성 대조군과 확실한 통계적 차이를 나타냄
- (3) 투여군 및 결과 분석용 세포 수가 적절함
- (4) 용량 설정 기준에 따라 최고 투여용량이 설정됨

3. 결과의 평가

어느 한 용량에서 음성대조군과 비교하여 유의적으로 증가하거나, 시험조건 하에서 용량 의존적인 증가가 보이거나, 음성 대조군의 허용 범위를 넘었을 때 양성으로 판단한다. 음성 대조군과 비교하여 어느 용량에서도 유의적인 증가가 없고, 용량 상관성이 없으며, 모든 결과가 음성 대조군의 범위 내에 있으면 음성으로 판단한다.

4. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

4.1 시험기관의 명칭 및 소재지

4.2 시험책임자 및 담당자 성명

4.3 시험물질 정보

- (1) 식별 자료 및 CAS 번호
- (2) 물리적 성질과 순도
- (3) 물리화학적 성질
- (4) 시험물질의 안정성

4.4 시험물질의 준비

- (1) 용매 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성
- (3) 노출 방법에 따른 시험물질 조제 및 분석

4.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통 및 선정근거
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 표시 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 군별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 체중, 1 주 이상 시험의 경우 시험 중 개별 동물의 체중

4.6 시험조건

- (1) 음성(용매) 및 양성 대조군 설정 조건
- (2) 용량 설정 시험 조건
- (3) 투여용량 선정근거
- (4) 투여 경로 선정 근거 및 투여방법, 투여일정
- (5) 시험물질 준비 및 투여의 세부사항
- (6) 시험물질의 표적 조직 도달을 확인하는 방법
- (7) 사료 및 음용수 중 함유된 시험물질의 농도(ppm)로부터 실제 투여량 (mg/kg 체중/일)으로 환산
- (8) 사료 및 음용수 성적서
- (9) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점
- (10) 표본 추출 및 슬라이드 제작 방법
- (11) 독성의 관찰 또는 측정방법
- (12) 시험의 성립 조건

- (13) 분열중기정지물질의 특성/농도/표본 채취 전 투여량과 투여시간
- (14) 이상(aberrations) 산정 기준
- (15) 동물 당 분석된 중기 세포의 수 및 유사분열 지수 결정을 위해 분석된 세포의 수
- (16) 양성, 음성 또는 결정보류 판정 기준

4.7 결과

- (1) 독성 증상
- (2) 유사 분열 지수
- (3) 이상(aberrations) 및 이상 세포(aberrant cells)의 유형과 수
- (4) 각 시험군 당 평균과 표준 편차 및 전체 이상(aberrations)의 수와 이상 세포(aberrant cells)의 수
- (5) 배수성 그리고/또는 내재복제된 세포의 빈도 및 배수성의 변화
- (6) 용량반응관계
- (7) 통계분석법
- (8) 골수 노출 자료
- (9) 양성 혹은 음성 반응 충족 기준
- (10) 음성 및 양성대조군 결과

4.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제31항 유전독성시험 (마우스 유전성 전좌시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 포유류 1 세대 자손의 생식세포에서 구조적이고 수적인 염색체 변화를 유발하는 물질을 확인하는 데 그 목적이 있다. 이 시험에서 알 수 있는 염색체 변화의 종류는 상호 전좌이며, 암컷 자손인 경우는 X-염색체 소실이다.

2. 용어 정의

2.1 유전성 전좌

염색체 일부가 같은 염색체의 다른 부분으로 위치가 변화하거나, 또는 다른 염색체 상의 위치로 변화하는 염색체 이상 현상. 특히 2 개의 비상동염색체에서 절단이 일어나서 그 부분을 교환하는 것을 상호 전좌라 함.

2.1 이형 접합성

상동염색체 상 대립하는 유전자 자리에 다른 대립 유전자가 존재하는 상태

II. 시험

1. 원리

시험 물질에 의해 발생한 포유류 1 세대 자손의 염색체 변화, 즉 상호전좌를 세포 유전학적 분석을 통하여 밝혀내는 시험이다. 전좌 보인자나 XO-암컷은 생식력이 감소하며 이는 세포 유전학적 분석을 실시할 F1 자손으로 선택되는 근거가 된다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

성적으로 성숙한 마우스 사용을 권장한다. 특정계통의 마우스를 사용할 필요는 없으나 평균 산자수가 최소 8 마리가 넘고 그 수가 비교적 일정한 마우스를 사용한다. 자발적으로 일어나는 전좌 빈도와 양성 결과를 확인하기 위해 필요한 최소한의 유도 비율에 따라 필요한 동물의 수를 결정하는데, 투여량 수준 당 F1 수컷 500 마리 정도가 필요하다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적 또는 같은 성별의 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넢리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고형의 시험물질은 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 분산시켜 사용하며, 액체물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 가능한 한 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 한다. 수용성인 용제 또는 보조제의 사용을 우선적으로 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매/보조제 이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적정성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

생식 행동과 생존률에 영향을 미치지 않으면서 최소한의 독성 효과를 나타내는 최대 투여 용량을 설정한다. 최대 투여 용량이 설정되면 최고용량보다

낮은 수준의 단계별 용량이 설정되어야 하며 용량반응 상관성을 확인하기 위해서는 최소 3 개 이상의 용량설정이 필요하다. 단회 투여인 경우 최대 5 g/kg, 반복 투여인 경우 최대 1 g/kg/day로 진행한다. 이 투여량으로 시험 진행이 불가능한 경우에는 가능한 최대 투여량으로 시험한다.

3.2 대조군

매 시험마다 동시에 수행되는 양성과 음성 (용매 또는 보조제) 대조군을 포함하여야 한다. 동일 실험실에서 최근에 실시한 양성 대조군 결과가 있는 경우 활용이 가능하다.

3.3 시험물질의 투여 및 시험동물 교배

단회 투여가 일반적으로 사용되지만, 주 7 일씩 35 일 동안 시험물질을 투여할 수도 있다. 투여 방법은 일반적으로 경구 또는 복강 내 주입을 이용한다. 가능한 한 인체에서의 노출 경로를 고려한다.

교배 횟수는 처리 계획에 의해 결정하되, 교배 시기가 끝나면 암컷들은 케이지 당 한 마리씩 격리시킨다. 암컷이 분만 시 날짜, 산자수, 자손의 성별을 기록한다. 모든 수컷 자손이 젖을 떼 후, 시험에 포함되지 않는 모든 암컷 자손은 폐기하도록 한다.

3.4 전좌 이형 접합성 확인 시험

다음 두 가지 방법 중 선택한다.

- (1) F1 자손의 생식능 시험을 거친 후 세포 유전학적 분석을 통한 전좌 보인자 확인
- (2) 생식능 시험을 통한 선별을 거치지 않고 모든 수컷 F1 자손의 세포 유전학적 분석을 통한 전좌 보인자 확인

3.4.1 생식능 시험

교배된 암컷의 산자수 관찰 및 자궁 내 내용물 분석을 통하여 F1 개체의 생식력 감소를 확인한다.

3.4.1.1 산자수 관찰

시험 대상이 F1 수컷인 경우, 집단 내 암컷과 개별적으로 사육된다. 교배 후 18 일째 되는 날부터 케이지를 매일 관찰하여, 산자수와 F2 자손의 성별을 기록하고 산자는 폐기한다.

시험 대상이 F1 암컷인 경우, 암컷 전좌 보인자 확인은 그들의 수컷 자손의 세포 유전학적 전좌 분석을 통해 가능하므로, 적은 수의 F2 자손을 남겨둔다. XO-암컷은 그들 자손의 수컷 대 암컷 비율이 1 : 1에서 1 : 2로 변화하는 것을 통하여 식별한다.

3.4.1.2 자궁 내용물 분석

전좌 보인자로 인한 생식력 감소는 배아 사망으로 인해 산자 수 감소를 나타낸다. 자궁 내 사망한 착상 수가 많은 경우 시험대상동물이 전좌를 가지고 있음을 나타내는 지표가 된다. 시험 대상 F1 수컷은 각각 두 마리 혹은 세 마리 암컷과 교배시킨 후, 다음날 아침에 질전을 관찰하여 수태 여부를 평가한다. 이후, 암컷을 14 일 ~ 16 일에 안락사하고, 자궁 안의 생존 혹은 사망한 착상수를 확인한다.

3.4.2 세포 유전학적 분석

공기 건조법(Air-drying technique)으로 정소 표본을 준비한다. 제 1 정모세포의 이동기와 중기 1에서 다가 염색체 배열을 동정하여 전좌보인자를 구별한다. 적어도 두 세포에서 다가 염색체의 존재가 확인되는 경우, 본 개체를 전좌 보인자로 평가한다.

생식능 평가를 통한 교배 선택을 실시하지 않은 경우, 모든 F1 수컷에서 세포 유전학적 분석을 실시하며, 적어도 개체 한 마리당 25 개의 이동기 또는 중기 1의 세포를 현미경으로 관찰한다. 각 10 개의 세포에서 비정상적으로 길거나 짧은 염색체가 관찰된다면, 수컷 불임성 전좌로 판단한다. XO-암컷의 경우, 10 개의 유사분열 표본에서 39 개의 염색체가 관찰된다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

다음 결과는 표로 나타낸다.

- 각 교배 시기마다 출생 시, 이유기의 평균 산자수 및 성비
- 생식능 평가를 위한 모든 정상 교배의 평균 산자수와 F1 전좌 보인자의 산자수
- 자궁 내용물 분석을 위한 정상 교배 개체의 생존 및 사망 착상 수 및 F1 전좌 보인자의 생존 및 사망 착상 수
- 세포 유전학적 분석을 위한, 전좌보인자 별 다가 배열의 숫자와 종류, 총 세포 수
- 불임 개체인 경우 총 교배 수, 교배 지속 시기(시험 개체의 체중과 세포 유전학적 분석 결과 포함)
- XO-암컷의 경우, 평균 산자 수, F2 자손의 성비, 세포 유전학적 분석 결과 위의 결과는 적절한 통계분석법에 의해 평가한다.

2. 결과의 평가

다음 두 가지 기준 중 하나로 양성 반응을 판단한다.

- (1) 통계학적으로 유의한 전좌 수 증가가 시험 기간 중 적어도 한 번 관찰 되는 것
 - (2) 통계학적으로 유의한 용량 의존적인 전좌 수의 증가를 확인하는 것
- 이 두 경우에 해당되지 않는 시험물질은 비-돌연변이성으로 판단한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

- (1) 식별 데이터 및 CAS 번호
- (2) 물리적 특성과 순도
- (3) 물리화학적 성상

3.4 용매/보조제 정보

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성

3.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량
- (6) 대조군과 실험군의 교배된 부모 개체의 수(암컷 및 수컷)

3.6 시험조건

- (1) 음성대조군(용매/보조제) 및 양성대조군 설정 조건
- (2) 용량 설정 시험 조건
- (3) 투여용량 선정근거
- (4) 투여 경로 선정 근거 및 투여방법, 투여일정
- (5) 시험 물질 준비 및 투여의 세부사항
- (6) 시험 물질의 표적 조직 도달을 확인하는 방법
- (7) 사료 및 음용수에 포함된 시험 물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량 (mg/kg 체중/일)으로 환산
- (8) 사료 및 음용수 성적서

(9) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점

(10) 교배 일정

(11) 독성의 관찰 또는 측정방법

3.7 결과

(1) 암컷 한 마리당 자손 수와 성별

(2) 전좌 분석을 위해 사육한 자손의 수와 성별

(3) 전좌 분석 시기와 기준

(4) 전좌 보인자 수

(5) 필요한 경우, 교배 데이터나 자궁 내용물 데이터

(6) 세포 유전학적 평가 절차

(7) 통계분석법

(8) 양성 혹은 음성반응 충족 기준

(9) 음성 및 양성대조군 결과

3.8 시험결과에 대한 해석 및 고찰

제32항 유전독성시험 (포유류 간세포를 이용하는 비정기적 DNA 합성시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 간세포 내에서 DNA 손상 및 후속 복구를 지표로 하여 생체내 화학물질의 유전독성을 평가하는 데 그 목적이 있다. 간은 흡수된 화합물의 주요 대사 부위이므로 생체내 DNA 손상을 측정하기에 적절한 부위이다.

2. 용어 정의

2.1 비정기적 DNA 합성(UDS, Unscheduled DNA synthesis)

화학물질이나 물리적 요인에 의해 손상이 유발된 DNA 부위의 절제 및 제거 이후에 나타나는 DNA 복구를 위한 합성

2.2 순핵 결점(NNG, Net nuclear grains)

자기방사법을 이용하는 UDS 시험에서 세포의 UDS 활성화에 대한 정량적 측정이며, 핵 결점 수(NG, Nuclear grains)에서 세포핵에 해당하는 크기의 세포질 영역 내에 있는 평균 세포질 결점 수(CG, Cytoplasmic grains)를 빼서 계산

$$NNG = NG - CG$$

II. 시험

1. 원리

생체내 포유류 간 세포를 이용한 비정기적 DNA 합성 시험(UDS)은 화학물질이나 물리적 요인에 의해 유발된 DNA 손상 이후 DNA 복구 합성을 통해 화학 물질의 유전 독성을 평가하는 방법이다. DNA 복구 합성을 판단하기 위해 삼중 수소로 표시된 티미딘(^3H -TdR)을 이용한다.

2. 시험의 준비

2.1 시험동물

주로 랫드 사용을 권장한다. 시험 개시 시 시험동물의 중량 변동이 최소한 이어야 하며 평균 중량의 20 %가 넘지 않도록 한다. 동물 수는 시험군 당 최소 3 마리 이상을 사용하고 시험 전 최소한 5 일 이상의 순화기간을 둔다. 암·수간에 독성에 대한 감수성 차가 없다고 판단되는 경우 한 가지 성으로 시험하며 일반적으로 수컷을 이용한다. 단, 노출 대상이 성 특이성을 야기할 수 있는 물질은 암·수 가운데 적절한 성을 선택하여 사용한다. 각 동물의 식별을 용이하게 하기 위해 개개의 동물에 표시를 한다.

2.2 사육조건

사육실은 온도가 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도가 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육은 개별적 또는 같은 성별의 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 인공조명으로 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 넠리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고형의 시험물질은 적절한 용매나 보조제를 이용하여 용해 또는 현탁시켜 사용하며, 액체물질은 직접 또는 희석하여 사용한다. 조제물의 안정성자료가 확보되지 않을 경우 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성 영향이 없어야 하며, 동시에 시험물질과 화학적 반응을 일으키지 않아야 한다. 수용성인 용제 또는 보조제의 사용을 우선적으로 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매/보조제 이외의 것을 사용하는 경우, 이들 사용의 적정성을 증명할 수 있는 자료를 제시하여야 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성 정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량 설정예비시험을 수행할 수 있다. 일반적으로 최소 2 단계 투여 용량 수준을 설정한다. 동일 투여 요법으로 한 단계 더 높은 용량을 투여한다면 치사시 키리라 예상되는 투여량을 최고 투여 용량으로 설정한다. 상위 투여량의 50 % ~ 25 %로 다음 단계 투여 용량을 설정한다.

3.2 한계시험

2,000 mg/kg/day 용량에서 독성이 나타나지 않고, 구조상 유사한 물질의 유전독성 시험결과를 토대로 하여 유전독성이 없다고 예상된다면 전체 용량 연구를 시행할 필요가 없다. 예상되는 인체노출량에 따라 좀 더 높은 투여량 수준인 한계용량만으로 시험을 실시할 수 있다.

3.3 대조군

매 시험마다 적절한 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하여야 한다. 양성대조군은 UDS를 유발한다고 알려진 물질을 사용하여야 하며 목록은 아래 표 1과 같다. 이 외에도 다른 적절한 양성 대조군 물질을 사용할 수 있다.

시험군에서 시험물질을 투여하는 데 용매/보조제를 사용한다면 음성 대조군에 동일한 용매/보조제를 투여한다.

표 1. 포유류 간세포를 이용하는 비정기적 DNA합성 시험의 양성대조물질

표본 추출 시간	화학물질 및 CAS 번호
조기 표본 추출 시간 (2 시간 ~ 4 시간)	N-Nitrosodimethylamine [CAS 번호 62-75-9]
일반적인 표본 추출 시간 (12 시간 ~ 16 시간)	N-2-Fluorenylacetamide (2-AAF) [CAS 번호 53-96-3]

3.4 시험물질의 투여

일반적으로 단회 투여한다. 투여 방법은 일반적으로 위장관 튜브 또는 적합한 삽관 캐놀라를 이용한 위관투여법을 이용한다. 필요에 따라 다른 투여 경로도 허용될 수 있으나 복강 내 주입은 권장하지 않는다. 한 번에 투여될 수 있는 최대량은 동물의 크기에 따라 다르며 100 g당 2 mL를 초과하지 않도록 한다.

3.5 간세포 준비 UDS 분석을 위한 처리

일반적으로 처리 후 12 시간 ~ 16 시간에 동물로부터 간세포를 준비한다. 이 시간대에서 명확한 양성 반응을 나타내는 경우를 제외하고, 추가적으로 조기(처리 후 2 시간 ~ 4 시간)에 표본을 추출한다. 분리된 간을 Collagenase로 관류시킨 후 간세포를 분리 및 배양한다.

3.6 UDS 결정

^3H -TdR을 함유한 배지에 분리 간세포를 약 3 시간 ~ 8 시간 배양한다. 세포를 세척, 고정하여 건조한다. 각 동물 당 2 개 ~ 3 개의 슬라이드를 준비하여 암흑에서 노출된 방사선 사진 촬영용 유제 안에 슬라이드를 담근 후 현상액속에 함유된 은 입자(Silver grain)에 의해 생성된 검은 점을 계수한다.

3.7 분석

각 슬라이드에는 정상적인 형태학의 세포가 충분히 함유되어야 한다. 최소한 2 개의 슬라이드로부터 각 동물 당 100 개 세포를 계수한다. 분석에 앞서 모든 슬라이드를 독자적으로 암호화한다.

핵 전반에 걸친 핵 결점을 계수하고 아울러 핵의 크기와 같은 면적의 세포질 면적에서 나타난 세포질 결점을 계수한다. 세포질 결점 계수는 가장 많이 표시된 세포질 영역을 취하거나, 세포핵에 인접한 부분을 무작위로 2 군데 ~ 3 군데 취하여 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

개별 동물로부터 얻은 결과를 도표 형식으로 제시한다. 각 세포 별, 동물 별, 투여량과 시간 별로 핵 결점(NG) 계수 값에서 세포질 결점(CG) 계수 값을 뺀 순 핵 결점(NNG)의 수를 계산한다. 결과를 평가하는데 있어서 적절한 통계처리법을 사용할 수 있다.

2. 결과의 평가

다음 표 2를 기준으로 양성/음성 반응을 판단한다.

표 2. UDS 시험의 결과 판정 기준

	판정 기준
양성	(1) 기존 데이터를 근거로 미리 정해진 한계치를 초과하는 NNG 값 또는 (2) 대조군보다 유의하게 큰 NNG 값
음성	(1) 기존 대조군 한계치 이내/미만의 NNG 값 또는 (2) 동시 대조군보다 유의하게 크지 않은 NNG 값

3. 시험 결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

- (1) 식별 데이터 및 CAS 번호
- (2) 물리적 특성과 순도

- (3) 물리화학적 성상
- (4) 시험물질의 안정성

3.4 용매/보조제 정보

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 시험물질의 용해도 및 안정성

3.5 시험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구입처, 사육조건, 사료
- (4) 동물 식별 방법
- (5) 동물의 체중 범위, 각 그룹별 평균 및 표준 편차를 포함하여, 시험을 시작할 때 동물의 개별 중량

3.6 시험조건

- (1) 음성(용매/보조제) 및 양성대조군 설정 조건
- (2) 용량 설정 시험 조건
- (3) 투여용량 선정근거
- (4) 투여 경로 선정 근거 및 투여방법, 투여일정
- (5) 시험 물질 준비 및 투여의 세부사항
- (6) 시험 물질의 표적 조직 도달을 확인하는 방법
- (7) 사료 및 음용수 시험 물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량(mg/kg 체중/일)으로 환산
- (8) 사료 및 음용수 성적서
- (9) 안락사 및 진통 방법, 안락사 시점
- (10) 표본 추출 및 슬라이드 제작 방법
- (11) 독성의 관찰 또는 측정방법

- (12) 간세포 준비 및 배양 방법
- (13) 준비된 슬라이드의 수 및 채점된 세포의 수
- (14) 양성 및 음성 판정 기준

3.7 결과

- (1) 핵 결점(NG) 및 세포질 결점(CG) 및 순 핵 결점(NNG)에 대한 개별 슬라이드 및 동물/그룹 평균치
- (2) 용량반응관계
- (3) 통계분석법
- (4) 양성 혹은 음성반응 충족 기준
- (5) 음성 및 양성대조군 결과
- (6) 범위/평균 및 표준 편차를 포함한 기존 음성 및 양성 대조군 자료
- (7) 복구 중인 세포의 수, S기 세포의 수
- (8) 세포의 생존도

3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제33항 피부과민성시험(국소림프절시험, LLNA)

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 방사성동위원소를 이용하여 림프구 증식을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 정의

2.1. 피부과민성

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2. 자극지수

시험물질의 피부과민반응성 정도를 평가하기 위해 계산된 값. 시험물질 처리군의 림프구 증식 값을 음성대조군의 림프구 증식 값으로 나눈 값

2.3. 이상치(Outlier)

어떤 집단에서 무작위로 추출된 샘플에서 다른 값과는 현저하게 다르게 벗어난 값

II. 시험

1. 원리

국소림프절시험법(Local Lymph Node Assay, LLNA)의 기본원리는 과민성물질이 도포부위에서 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도한다는 것이다. 림프구의 증식은 시험물질의 투여량과 알레르기 유발능에 비례하며, 이 원리를 이용하여 시험물질의 과민성을 정량적으로 측정할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

- (1) 일반적으로 CBA/Ca 또는 CBA/J 계통의 마우스를 사용하며, 출산경험이 없거나 비임신 상태인 생후 8 주령 ~ 12 주령의 건강한 암컷을 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다. 정당한 이유가 있으면 다른 동물을 이용해도 무관하다.
- (2) 실험동물은 집단으로 사육하며 사육실 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육실 청소시간 이외에는 가능한 습도를 50 % ~ 60 %로 조절한다. 사료는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음용수와 함께 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.
- (3) 동물은 무작위로 선별하고, 개체식별을 위한 표식을 하되 귀 부위에는 표식처리를 하지 않는다. 실험실 조건에 순화되도록 최소한 투여개시 5 일 전부터 케이지에 순화시킨다. 시험물질 처치시작 전에 피부병변이 없는 것을 모든 동물에서 확인하여야 한다.

2.2 시험물질

고체시험물질은 적당한 부형제(용매)에 용해 또는 현탁시키고, 마우스의 귀에 도포하기 전에 적절히 희석한다. 액체시험물질은 도포하기 전에 적절히 희석한다. 보존기간에 대한 안정성자료가 확보되지 않는 한, 시험물질은 사용할 때마다 매일 조제한다.

3. 시험방법

3.1. 신뢰성 확인

이 시험을 실행하는 시험기관의 신뢰성 확인을 위해 반드시 양성대조물질과 음성대조물질을 사용하여 그 반응을 확인하여야 한다. 양성대조물질로는 헥실신나믹알데히드(Hexylcinnamicaldehyde, CAS 번호. 101-86-0)와 머캅토벤조치아졸(mercaptobenzothiazole, CAS 번호. 149-30-4)이 권장되며 양성대조군은 음성대조군보다 자극지수가 3 보다 크게 나타나야 한다. 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극이나 전신독성을 유발하지 않도록 선택하여야 하고, 반응유도는 재현성이 있어야 하며 자극지수가 20 보다 클 정도로 과도하지 않도록 한다. 매 시험마다 양성대조군을 두는 것을 원칙으로 한다.

3.2 동물의 수와 투여용량

- (1) 최소 3 개 용량이 설정되어야 하며 투여용량 당 최소 4 마리의 동물이 사용되어야 한다. 여기에 양성대조군과 음성대조군이 추가된다. 연속적인 투여용량은 일반적으로 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등과 같은 적절한 농도단계로부터 선택된다.
- (2) 국소피부자극과 전신독성이 과도하게 나타나는 용량을 피하면서 노출이 극대화될 수 있는 용량범위를 선택하여야 한다. 이러한 정보가 존재하지 않는다면, 본 시험의 용량결정을 위한 예비시험이 필요하다.

3.3 용매(부형제)의 선택

용매(부형제)는 실험결과를 방해하거나 결과에 영향을 미치지 않아야 하며, 시험물질을 실험동물에 처리하기에 적절한 용액 또는 현탁액을 만들면서 고농도를 얻을 수 있도록 용해도를 극대화 시킬 수 있어야 한다. 아세톤 : 올리브오일(4 : 1, v/v), N, N-디메틸포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜과 디메틸설폭사이드 등을 사용할 수 있으며, 충분한 과학적 근거가 있다면 다른 용매(부형제)도 사용할 수 있다.

3.4 예비스크리닝시험

- (1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 림프절 증식을 평가하지 않고 투여군 당 마릿수가 적다는 점이 본 시험과 다르다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포한다. 예비시험의 최고농도는 시험물질이 액체일 경우에는 100 % 원액이어야 하며 고체나 현탁액의 경우 조제가 가능한 최대농도여야 한다.
- (2) 실험동물은 투여군 당 한 마리 혹은 2 마리를 사용한다. 모든 마우스에 대해 전신독성 및 국소반응 등 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날(6 일 차) 기록한다.
- (3) 각 마우스의 양쪽 귀 모두 홍반 발생 여부를 매일 관찰하고, 표 1의 홍반 점수를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께 측정기를 통해 1 일 차(예비투여), 3 일 차(1 일 차 투여 후 48 시간) 그리고 6 일 차에 귀의 두께를 측정한다. 어느 날이든 3 이상의 홍반점수가 나오거나 귀의 두께가 25 % 이상으로 증가하는 경우에는 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험에서 사용할 최고농도는 예비시험에서 전신독성과 과도한 국소피부자극성을 보이지 않는 농도보다 한 단계 아래의 낮은 농도로 정한다.

표 1. 홍반 점수

관찰 결과	점수
홍반이 없을 경우	0
매우 약한 홍반이 나타날 경우(겨우 인지될 정도)	1
홍반이 명확하게 나타난 경우	2
중증도에서 심각한 상황의 홍반	3
심각한 홍반(적홍색)에서 홍반의 등급을 매기기 어려울 정도의 가피가 생기는 수준	4

3.5. 본 시험

3.5.1 일정별 수행절차

(1) 시험 1 일 차

각 동물의 체중과 임상 관찰사항을 개체별로 파악하여 기록한다. 적절히 희석한 시험물질, 용매(음성대조물질), 양성대조물질을 각각 양쪽 귀의 뒷면에 25 μ L씩 1 회 도포한다.

(2) 시험 2 일 차 및 3 일 차

첫째 날에 실시한 도포 과정을 반복한다.

(3) 시험 4 일 차 및 5 일 차

모든 동물에 대해 시험물질, 용매, 양성대조물질 등을 도포하지 않는다.

(4) 시험 6 일 차

각 동물의 체중을 기록한다. 시험군과 대조군의 마우스 꼬리에 20 μ Ci(7.4×10^5 Bq)의 ^3H -methylthymidine을 함유하는 멸균인산완충용액 또는 2 μ Ci(7.4×10^4 Bq)의 ^{125}I -iododeoxyuridine과 10^{-5} M fluorodeoxyuridine을 함유하는 멸균인산완충용액 250 μ L을 정맥주사 한다. 5 시간 후, 마우스를 희생시켜 양쪽 귀의 림프절을 군별로 또는 개체별로 채취하여 합한다.

3.5.2. 세포부유액의 조제

각 동물로부터 얻은 림프절로부터 단일세포를 유리시켜 부유액을 만든다. 이때, 200 μ m의 스테인리스 철판 등을 이용한다. 림프절 단일세포를 인산완충용액으로 2 회 세척하고 5 % Trichloroacetic acid(TCA)를 4 °C에서 18 시간 동안 처리하여 DNA 침전을 얻는다. 침전을 1 mL의 TCA로 재현탁시킨 후 방사능 측정용 바이알 혹은 튜브로 옮긴다.

3.5.3. 세포증식 측정(임파구에 유입된 방사능 측정)

^3H -methylthymidine은 β -선을 측정하여 dpm(disintegration per minute)단위로 나타내며, ^{125}I -iododeoxyuridine은 ^{125}I -계수로 측정하여 dpm 단위로 표시한다. 임파구 DNA에 유입된 방사성동위원소의 양을 개체 당 dpm, 또는 군 당 dpm으로 나타낸다.

3.5.4. 일반증상

시험물질 도포 부위의 국소자극, 전신독성 등에 대한 임상적 관찰을 적어도 하루에 한 번 주의 깊게 관찰하고 체계적으로 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

1.1. 각 투여군의 결과는 자극지수(SI)로 나타낸다. 개체별 처리방식에서 SI 값은 각 투여군의 마우스 당 dpm의 평균 값 또는 양성대조군의 dpm의 평균 값을 음성대조군(용매처리군)의 마우스 당 dpm의 평균 값으로 나누어 산출한다. 군별 SI를 산출하는 경우에는 림프절을 합하여 측정한 처리군의 dpm 값을 음성대조군 dpm으로 나눈다.

1.2. 양성 결과의 판정은 SI가 3 이상인 경우로 한다. 그러나 SI 값이 3 근처의 경계선에 있을 때 이를 양성으로 판정해야 할 것인지에 대한 결정은 용량-반응의 강도, 통계적 유의미, 음성대조군과 양성대조군의 일관성 있는 결과 등을 참고하여 결정한다.

1.3. 각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부 반응을 보여주는 결과는 표로 정리한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과의 보고는 다음 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질

- 2.1.1. 물질데이터(CAS 번호, 출처, 순도, 로트 번호 등)
- 2.1.2. 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도 등)
- 2.1.3. 제제일 경우, 구성성분과 구성성분의 상대 함량비

2.2. 용매(부형제)

- 2.2.1. 확인시험데이터(순도, 사용부피)
- 2.2.2. 용매선정의 논리적 근거

2.3. 실험동물

- 2.3.1. CBA 마우스의 구매처
- 2.3.2. 동물의 미생물학적 상태(알고 있다면)
- 2.3.3. 동물의 수와 주령
- 2.3.4. 동물의 구매처와 사육조건, 사료 등

2.4. 시험조건

- 2.4.1. 시험물질 조제와 적용에 관한 세부사항
- 2.4.2. 용량선정의 논리적 근거(예비시험 수행 시 그 결과 포함)
- 2.4.3. 용매와 시험물질의 사용농도와 적용된 시험물질의 총 양
- 2.4.4. 사료와 음용수의 세부사항(사료 종류와 출처, 음용수의 출처를 포함하여)
- 2.4.5. 시험물질 처리(도포)와 조직시료채취에 관한 세부적인 일정
- 2.4.6. 독성 측정방법
- 2.4.7. 양성 또는 음성에 관한 판정기준
- 2.4.8. 시험계획서 이탈사항의 세부내용, 시험계획서 이탈사항이 시험계획과 결과에 어떤 영향을 주었는지에 관한 설명

2.5. 신뢰성 확인의 결과

양성대조물질, 음성대조물질, 시험물질, 농도 및 용매에 관한 정보를 포함하여 가장 최근에 시행된 신뢰성 확인결과의 요약

2.6. 결과

2.6.1. 각 마우스의 투여시작일과 부검일 시점의 체중, 각 처리군의 체중 평균과 편차

2.6.2. 피부과민성을 포함하여 독성발현이 시작된 시점과 경과, 독성의 증상

2.6.3. 각 마우스에 관한 결과 값의 표(개체별 처리방식) 또는 dpm, SI의 평균 값/중앙 값(군별 처리방식)

2.6.4. 각 투여군의 동물 dpm의 평균 및 편차 값. 그리고 개별동물처리방식의 결과에서 이상치(outlier)에 대한 분석결과

2.6.5. 개체별 동물처리방식을 사용했을 때 시험물질 처리군과 대조군에서의 동물 간 차이를 고려한 변수의 측정방법과 산출된 SI 값

2.6.6. 용량-반응관계

2.6.7. 통계학적 분석방법

2.7. 결과의 토의

시험물질이 과민성물질인지에 대한 결론과 함께 결과 값, 용량-반응분석, 통계 분석 등에 대한 간단한 의견 등

제34항 피부과민성시험(국소림프절시험, LLNA: DA)

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 ATP(adenosine triphosphate) 함량분석을 통해 림프구 증식을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 정의

2.1. 피부과민성

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2. 자극지수

시험물질의 피부과민반응성 정도를 평가하기 위해 계산된 값. 시험물질 처리군의 림프구 증식 값을 음성대조군의 림프구 증식 값으로 나눈 값

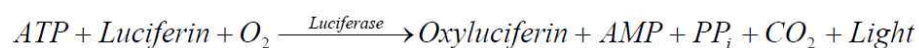
2.3. 이상치(Outlier)

어떤 집단에서 무작위로 추출된 샘플에서 다른 값과는 현저하게 다르게 벗어난 값

II. 시험

1. 원리

시험물질이 도포부위에 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도하는 정도에 따라 피부과민성이 평가된다. 림프구 증식은 ATP 함량으로 평가되며 ATP 함량은 루시페라제 활성을 이용한 생물발광방법으로 측정된다.



2. 시험의 준비

2.1 실험동물

- (1) 일반적으로 CBA/J 계통의 마우스를 사용하며, 출산경험이 없거나 비임신 상태인 생후 8 주령 ~ 12 주령의 건강한 암컷을 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다. 정당한 이유가 있으면 다른 동물을 이용해도 무관하다.
- (2) 실험동물은 집단으로 사육하며 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 되도록 유지한다. 사육실 청소시간 이외에는 가능한 습도를 50 % ~ 60 %로 조절한다. 사료는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음용수와 함께 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.
- (3) 동물은 무작위로 선별하고, 개체식별을 위한 표식을 하되 귀 부위에는 표식처리를 하지 않는다. 실험실 조건에 순화되도록 최소한 투여개시 5 일 전부터 케이지에 순화시킨다. 시험물질 처치 시작 전에 모든 실험동물에서 피부병변이 없는 것을 확인하여야 한다.

2.2 시험물질

고체시험물질은 적당한 부형제(용매)에 용해 또는 현탁시키고, 마우스의 귀에 도포하기 전에 적절히 희석한다. 액체시험물질은 도포하기 전에 적절히 희석한다. 보존기간에 대한 안정성자료가 확보되지 않는 한, 시험물질은 사용할 때마다 매일 조제한다.

3. 시험방법

3.1. 신뢰성 확인

이 시험을 실행하는 시험기관의 신뢰도 확인을 위해 반드시 양성대조물질과 음성대조물질을 사용하여 그 반응을 확인하여야 한다. 양성대조물질은 25 % 헥실신나믹알데히드(Hexylcinnamicaldehyde, CAS 번호. 101-86-0)와 25 % 유제놀(Eugenol, CAS 번호 97-53-0)이며 아세톤과 올리브오일의 4 : 1(v/v) 혼합용매에 녹인 것을 권장한다. 양성대조물질은 자극지수가 1.8 이상 ($SI \geq 1.8$) 나타나야 한다. 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극 또는 전신독성을 유발하지 않는 농도를 선택하여야 하고, 반응유도는 재현성이 있어야 하며 자극지수가 10 보다 큰 정도로(> 10) 과도하지 않도록 한다. 시험마다 양성대조군을 두는 것을 원칙으로 한다.

3.2 동물의 수와 투여용량

- (1) 최소 3 개 용량이 설정되어야 하며 투여용량 당 최소 4 마리의 동물이 사용되어야 한다. 여기에 양성대조군과 음성대조군이 추가된다. 연속적인 투여용량은 일반적으로 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등과 같은 적절한 농도단계로부터 선택된다.
- (2) 국소피부자극과 전신독성이 과도하게 나타나는 용량을 피하면서 노출이 극대화될 수 있도록 용량범위를 선택하여야 한다. 이러한 정보가 존재하지 않는다면, 본 시험의 용량결정을 위한 예비시험이 필요하다.

3.3 용매(부형제)의 선택

용매(부형제)는 실험결과를 방해하거나 결과에 영향을 미치지 않아야 하며, 시험물질을 실험동물에 처리하기에 적절한 용액 또는 현탁액을 만들면서 고농도를 얻을 수 있도록 용해도를 극대화 시킬 수 있어야 한다. 아세톤 : 올리브오일(4 : 1, v/v), N, N-디메틸포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜과 디메틸설폭사이드 등을 사용할 수 있으며, 충분한 과학적 근거가 있다면 다른 용매(부형제)도 사용할 수 있다

3.4 예비스크리닝시험

- (1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 림프절 증식을 평가하지 않고 투여군 당 마리수가 적다는 점이 본 시험과 다르다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포한다. 예비시험의 최고농도는 시험물질이 액체일 경우에는 100 % 원액이어야 하며 고체나 현탁액의 경우 조제가 가능한 최대 농도여야 한다.
- (2) 실험동물은 투여군 당 한 마리 혹은 2 마리를 사용한다. 모든 마우스에 대해 전신독성 및 국소반응 등 시험물질노출에 따른 임상증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험종료 전날(6 일 차) 기록한다.
- (3) 각 마우스의 양쪽 귀 모두 홍반발생 여부를 매일 관찰하고, 표 1의 홍반점수를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께측정기를 통해 1 일 차(예비투여), 3 일 차(1 일 차 투여 후 48 시간), 7 일 차 및 8 일 차에 귀의 두께를 측정한다. 어느 날이든 3 이상의 홍반점수가 나오거나 귀의 두께가 25 % 이상으로 증가하는 경우에는 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.
- (4) 본 시험에서 사용할 최고농도는 예비스크리닝시험에서 전신독성과 과도한 국소피부자극성을 보이지 않는 농도보다 한 단계 아래의 낮은 농도로 정한다.

표 1. 홍반 점수

관찰 결과	점수
홍반이 없을 경우	0
매우 약한 홍반이 나타날 경우(겨우 인지될 정도)	1
홍반이 명확하게 나타난 경우	2
중증도에서 심각한 상황의 홍반	3
심각한 홍반(적홍색)에서 홍반의 등급을 매기기 어려울 정도의 가피가 생기는 수준	4

3.5. 본 시험

3.5.1. 일정별 수행절차

(1) 1 일 차

각 동물의 체중과 임상적인 관찰결과를 개체별로 확인하고 기록한다. 1 % 소듐라우릴설페이트(Sodium Lauryl Sulfate, SLS)용액에 붓을 담근 후 마우스 귓등에 4 회 ~ 5 회 붓질을 하여 귓등 전체에 SLS를 고르게 도포한다. SLS처리 한 시간 후에, 적절한 시험농도로 희석한 시험물질 25 μ L를 마우스 귓등에 도포한다. 용매대조군(음성대조물질), 동시에 사용된 양성대조군도 시험물질과 같은 방식으로 마우스 귓등에 도포한다.

(2) 2 일 차, 3 일 차 및 7 일 차

첫째 날에 실시한 것과 같은 방법으로 1 % SLS용액의 전처리와 시험물질 도포과정을 반복한다.

(3) 4 일 차, 5 일 차 및 6 일 차

모든 동물에 대해 도포 과정을 실시하지 않는다.

(4) 8 일 차

각 동물의 체중 및 임상관찰결과를 기록한다. 7 일 차에 시험물질을 처리한 후 약 24 시간 ~ 30 시간 범위의 시점에서 인도적으로 동물을 안락사 시킨다. 귀 림프절을 절제하고 각각을 인산완충생리식염수(PBS)에 처리한다.

3.5.2. 세포부유액의 조제

- (1) 2 개의 유리 슬라이드 사이에 림프절을 끼운 후 림프절이 부서질 정도의 가벼운 압력을 가한다. 조직이 분쇄되어 두 슬라이드 틈으로 얇게 퍼져나가는 것을 확인한 후, 2 개의 슬라이드 틈에 끼어 있는 조직세포를 PBS로 현탁시킨다. 이때 각 슬라이드를 분리하고 한쪽을 붙잡아 페트리디쉬 쪽으로 기울인 후 PBS로 슬라이드를 세척하면서 스크래퍼로 긁어내는 방식으로 세포부유액을 조제한다. 이때, 음성대조군 마우스의 림프절은 매우 작으므로 조심히 작업하여 SI 값에 인위적인 영향을 미치지 않도록 한다.
- (2) 두 슬라이드를 세척하면서 세포를 모으는데 총 1 mL의 PBS만을 사용 하여야 한다. 페트리디쉬에 모인 림프절 세포부유액을 스크레이퍼로 가볍게 저어주면서 균질한 액을 만든다. 세포부유액 20 μ L를 취하고 PBS 1.98 mL와 섞어 2 mL 시료를 만든다. 두 번째의 2 mL 시료도 첫 번째와 같은 방식으로 만들어 한 마리의 마우스로부터 총 2 개의 시료를 조제한다.

3.5.3. 세포증식측정(림프구의 ATP 함량측정)

- (1) 림프절 ATP 함량은 루시페린/루시페라제 활성원리에 따라 제작된 ATP 측정키트를 사용하여 측정하며, 측정단위는 상대발광단위(Relative Luminescence Units, RLU)를 사용한다.
- (2) 각 동물을 안락사 시킨 후부터 ATP 측정에 걸리는 시간은 각각의 동물마다 일정하게 유지되도록 해야 한다. 동물의 부검 후 ATP 함량은 점점 감소하는 것으로 알려져 있으므로 ATP 측정은 사망 후 약 30 분 이내에 실시하도록 한다.
- (3) ATP 측정은 양쪽 귀로부터 각각 제조한 2 mL 시료에 대해 모두 실시함으로써 동물 당 2 개의 ATP 측정결과를 생산한다. 이후 두 값에 대한 평균값을 결정하고 평균 값을 다음 단계의 계산과정에 사용한다.

3.5.4. 일반증상

시험물질 도포부위의 국소자극, 전신독성 등에 대한 임상적 관찰을 적어도 하루에 한 번 주의 깊게 관찰하고 체계적으로 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. 각 실험군의 결과는 SI로 나타낸다. SI는 투여군 또는 양성대조군의 평균 RLU(상대발광측정단위) 값을 용매대조군의 평균 RLU 값으로 나눈 값이다. 용매대조군의 평균 SI 값은 1이다.

1.2. SI 값이 1.8 이상일 때($SI \geq 1.8$) 그 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계 값에 존재하는 결과(예, SI 값이 1.8 ~ 2.5 일 때)가 양성인지 아닌지를 결정할 때에는 SI 값 외에도 용량-반응의 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적인 정보를 고려하여 판단한다.

1.3. 각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부반응을 보여주는 결과는 표로 정리한다.

2. 시험결과와 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다.

2.1. 시험물질

- (1) 물질데이터(CAS 번호, 만약 가능하다면; 출처, 순도; 알려진 불순물; 로트 번호)
- (2) 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)
- (3) 제제일 경우에는, 구성과 구성성분의 상대 함량비

2.2. 용매(부형제)

- (1) 물질데이터(순도, 농도, 사용부피)
- (2) 용매 선정의 논리적 근거

2.3. 실험동물

- (1) CBA 마우스의 기원
- (2) 동물의 미생물학적 상태(알고 있다면)
- (3) 동물의 수와 주령
- (4) 동물의 공급처와 사육조건, 사료 등

2.4. 시험조건

- (1) ATP 키트에 대한 출처, 로트 번호, 제조자의 품질보증 데이터
- (2) 시험물질용액 조제와 적용에 관한 세부사항
- (3) 용량설정의 논리적 근거(예비시험수행 시 그 결과 포함)
- (4) 용매(부형제)와 시험물질의 농도와 적용된 시험물질의 총 양
- (5) 사료와 음용수의 세부사항(사료의 종류와 출처, 음용수의 출처를 포함하여)
- (6) 시험물질처리(도포)와 조직시료채취에 관한 세부적인 일정
- (7) 독성 평가방법
- (8) 양성 또는 음성에 관한 판정기준
- (9) 시험계획서 이탈사항의 세부내용, 시험계획서 이탈사항이 시험계획과 결과에 어떤 영향을 주었는지에 관한 설명

2.5. 신뢰성 확인의 결과

- (1) 양성대조물질, 음성대조물질, 시험물질, 농도 및 용매에 관한 정보를 포함하여 가장 최근에 시행한 신뢰도 확인 결과의 요약
- (2) 동시양성대조물질, 주기적 양성대조물질, 동시음성대조물질(용매/부형제대조군)에 대한 자료
- (3) 동시양성대조물질을 사용하지 않았을 경우, 가장 최근의 주기적 양성대조물질에 대한 실험실 보고서와 날짜, 동시양성대조물질을 사용하지 않은 사유에 대한 정당성을 설명할 수 있는 과거양성대조물질에 대한 보고서

2.6. 결과

- (1) 각 마우스의 투여시작일과 부검일 시점의 체중, 각 처리군의 체중 평균과 편차
- (2) 피부자극성을 포함하여 독성이 발현이 시작된 시점과 경과, 독성의 증상
- (3) 각 동물에 대한 부검시간과 ATP 측정시간
- (4) 마우스 개체별 RLU 값 및 각 투여군에 대한 SI 값의 표
- (5) 각 투여군의 동물 RLU 값에 대한 평균 및 편차 값. 그리고 개별동물 처리방식의 결과에서 이상치(outlier)에 대한 분석결과
- (6) 개별동물처리방식을 사용했을 때 시험물질 처리군과 대조군에서의 동물 간 차이를 고려한 변수의 측정방법과 산출된 SI 값

(7) 용량-반응관계

(8) 통계학적 분석방법

2.7. 결과의 토의

시험물질이 과민성물질인지에 대한 결론과 함께 결과 값, 용량-반응분석, 통계 분석 등에 대한 간단한 의견

제35항 피부과민성 시험(국소림프절시험, LLNA: BrdU-ELISA)

가. BrdU-ELISA 시험법

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 림프구 중의 BrdU(비방사성물질 5-브로모-3-데옥시우리딘) 함량분석을 통해 림프구 증식을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 용어 정의

2.1 피부과민성(Skin sensitization)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2 자극지수(SI, Stimulation index)

시험물질의 피부과민반응성 정도를 평가하기 위해 계산된 값. 시험물질 처리군의 림프구 증식 값을 음성대조군의 림프구 증식 값으로 나눈 값

II. 시험

1. 원리

시험물질이 도포 부위에 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도하는 정도에 따라 피부과민성이 평가된다. 림프구 증식은 BrdU가 세포의 DNA에 얼마나 유입되었는지에 따라 평가되는데, 과산화효소(peroxidase)가 부착된 BrdU 특이항체를 이용하여 ELISA 기법으로 정량한 후 BrdU 표지값으로 나타낸다.

$$\text{BrdU labelling index} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

* 이때 em은 발광과장이며, ref는 reference과장이다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

- (1) 일반적으로 CBA/J 계통의 마우스를 사용하며, 출산경험이 없거나 비임신 상태인 생후 8 주령 ~ 12주령의 건강한 암컷을 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다. 정당한 이유가 있으면 다른 동물을 이용해도 무관하다.
- (2) 실험동물은 집단으로 사육하며 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 되도록 유지한다. 사육실 청소시간 이외에는 가능한 습도를 50 % ~ 60 %로 조절해야 한다. 사료는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음용수와 함께 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.
- (3) 동물은 무작위로 선별하고, 개체식별을 위한 표식을 하되 귀 부위에는 표식 처리를 하지 않는다. 실험실 조건에 순화되도록 최소한 투여개시 5 일 전부터 케이지에 순화시킨다. 시험물질 처치 시작 전에 모든 동물에서 피부병변이 없는 것을 확인해야 한다.

2.2 시험물질

고체시험물질은 적당한 부형제(용매)에 용해 또는 현탁시키고, 마우스의 귀에 도포하기 전에 적절히 희석해야 한다. 액체시험물질은 도포하기 전에 적절히 희석한다. 보존기간에 대한 안정성 자료가 확보되지 않는 한, 시험물질은 사용할 때마다 매일 조제한다.

3. 시험 방법

3.1 신뢰성확인

이 시험을 실행하는 시험기관의 신뢰도 확인을 위해 반드시 양성대조물질과 음성대조물질을 사용하여 그 반응을 확인해야 한다. 양성대조물질은 25 % 헥실신나믹알데히드(Hexylcinnamicaldehyde, CAS 번호 101-86-0)와 25 % 유제놀(Eugenol, CAS 번호 97-53-0)이며 아세톤과 올리브오일의 4 : 1 (v/v) 혼합용매에

녹인 것을 권장한다. 양성대조물질은 음성대조물질에 대해 자극지수가 1.6 이상 ($SI \geq 1.6$) 나타나야 한다. 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극 또는 전신 독성을 유발하지 않아야 하며 자극지수가 14를 초과하지 않는 범위에서 선정되어야 한다.

3.2 동물의 수와 투여용량

(1) 최소 3개 용량이 설정되어야 하며 투여용량 당 최소 4 마리의 동물이 사용되어야 한다. 여기에 양성대조물질과 음성대조물질이 추가된다. 연속적인 투여용량은 일반적으로 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등과 같은 적절한 농도계열로부터 선택된다.

(2) 국소피부자극과 전신독성이 과도하게 나타나는 용량을 피하면서 노출이 극대화될 수 있도록 용량선택을 해야 한다. 이러한 정보가 존재하지 않는다면, 본 시험의 용량 결정을 위한 예비시험이 필요하다.

3.3 용매의 선택

시험결과를 방해하거나 결과를 편향되게 만들지 않고, 시험물질을 실험동물에 처리하기에 적절한 용액/현탁액을 만들면서 고농도를 얻을 수 있도록 용해도를 극대화시킬 수 있는 것을 선택한다. 아세톤 : 올리브유(4 : 1, v/v), N, N-디메틸 포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜과 디메틸설폭사이드 등을 사용할 수 있다.

3.4 예비시험

(1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 림프절 증식을 평가하지 않고 투여군 당 마릿수가 적다는 점이 본 시험과 다르다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포한다. 예비시험의 최고농도는 시험물질이 액체일 경우에는 100 % 원액이어야 하며 고체나 현탁액의 경우 조제가 가능한 최대 농도여야 한다.

(2) 실험동물은 투여군 당 1 마리 혹은 2 마리를 사용한다. 모든 마우스에 대해

전신독성 및 국소반응 등 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날(6 일차) 기록한다.

(3) 각 마우스의 양쪽 귀 모두 홍반 발생 여부를 매일 관찰하고, 표 1의 홍반 점수를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께측정기를 통해 1 일차(예비 투여), 3 일차(1 일차 투여 후 48 시간), 6 일차에 귀의 두께를 측정한다. 어느 날이든 3 이상의 홍반점수가 나오거나 귀의 두께가 25 % 이상으로 증가하는 경우에는 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험에서 사용할 최고농도는 예비시험에서 전신독성과 과도한 국소피부 자극성을 보이지 않는 농도 중 최고농도로 정한다.

표 1. 홍반 점수

관찰 결과	점수
홍반이 없을 경우	0
매우 약한 홍반이 나타날 경우(겨우 인지될 정도)	1
홍반이 명확하게 나타난 경우	2
중증도에서 심각한 상황의 홍반	3
심각한 홍반(적홍색)에서 홍반의 등급을 매기기 어려울 정도의 가피가 생기는 수준	4

3.5 본시험

3.5.1 일정별 수행절차

(1) 1 일차

각 동물의 체중과 임상 관찰결과를 개체별로 확인하고 기록한다. 각 희석배율로 제조한 시험물질, 용매(음성대조물질), 양성대조물질 25 μ L를 마우스 귓등 양쪽에 각각 1 회 도포한다.

(2) 2 일차 및 3 일차

1 일차 수행한 것과 같은 방법으로 각각의 해당 물질을 도포한다.

(3) 4 일차

모든 동물에 대해 도포과정을 시행하지 않는다.

(4) 5 일차

BrdU(10 mg/mL)용액 0.5 mL를 복강에 투여한다(5 mg/mouse).

(5) 6 일차

각 동물의 체중 및 임상관찰결과를 기록한다. BrdU를 주입한지 24 시간 후, 인도적으로 동물을 안락사시킨다. 각 마우스의 양쪽 귀 림프절을 절제하고 각각을 인산완충생리식염수(PBS)에 처리한다.

3.5.2 세포부유액 조제

각 동물의 좌우 귀로부터 얻은 림프절로부터 단일세포를 유리시켜 부유액을 만든다. 이때, 망크기 200 μ m의 스테인리스 철망 등을 이용한다(예; 일회용 플라스틱 막자(유봉)로 림프절을 부순 후 #70 나일론 메쉬 사용). 음성대조군 세포부유액의 흡광도 값이 0.1 ~ 0.2 이내가 되도록 세포부유액 총량을 조정한다.

3.5.3 세포증식측정(림프구의 BrdU 함량측정)

BrdU는 상용화된 ELISA 키트를 사용하여 측정한다. 림프절 세포부유액 100 μ L을 마이크로 플레이트의 3 개의 웰에 각각 첨가한다. 림프절 세포의 고정 및 변성(fixation and denaturation) 후, BrdU의 항체를 각 웰에 첨가하여 반응시킨다. 반응하지 않은 여분의 BrdU의 항체는 세척하여 제거한 후, 기질용액을 각 웰에 첨가하여 발색시킨다. 370 nm에서의 흡광도를 측정한다(reference 파장 492nm).

3.5.4 일반증상

시험물질 도포 부위의 국소자극, 전신독성 등에 대한 임상적 관찰을 적어도 하루에 한 번 주의 깊게 관찰하고 체계적으로 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 각 실험군의 결과는 자극지수(SI)로 나타낸다. SI는 투여군 또는 양성대조군의 평균 BrdU 표지 값을 용매대조군의 평균 BrdU 표지값으로 나눈 값이다. 용매대조군의 평균 SI 값은 1이다. BrdU 표지 값은 아래와 같이 계산한다.

$$\text{BrdU labelling index} = (\text{ABS}_{\text{em}} - \text{ABS blank}_{\text{em}}) - (\text{ABS}_{\text{ref}} - \text{ABS blank}_{\text{ref}})$$

* 이때 em은 발광파장이며, ref는 reference 파장이다.

1.2 SI 값이 1.6 이상일 때($\text{SI} \geq 1.6$) 그 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계값에 존재하는 결과(예, SI 값이 1.6 ~ 1.9 일 때)가 양성인지 아닌지를 결정할 때에는 용량-반응의 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적인 정보를 고려하여 판단한다.

1.3 각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부 반응을 보여주는 결과는 표로 정리한다.

2. 시험결과의 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함돼야 한다.

2.1 시험물질

- (1) 출처, 로트 번호, 사용기한(알려진 경우)
- (2) 시험물질의 안정성(알려진 경우)

2.2 단일조성물질

- (1) 물리적 외관, 수용성 및 추가적인 물리 화학적 특성;
- (2) IUPAC 또는 CAS 이름, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드와 같은 화학적 식별, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 실현 가능한 불순물의 화학적 식별 등

2.3 다조성물질, UVCBs (Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질

- (1) 성분의 화학적 동일성, 정량적 발생 및 관련 물리·화학적 특성에 대해 가능한 한 많은 것

2.4 대조군(Controls)

- (1) 자료(CAS 번호, 출처, 순도; 알려진 불순물; 로트 번호)
- (2) 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)

2.5 용매(부형제)

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 물질자료(순도, 농도, 사용부피)

2.6 실험동물

- (1) CBA 마우스의 출처
- (2) 동물의 수, 주령 및 성별
- (3) 동물의 공급처, 사육조건, 사료 등
- (4) 동물의 미생물학적 감염 상태(알려진 경우)

2.7 시험조건

- (1) 투여용량 선정근거
- (2) 시험물질의 조제 및 투여의 세부사항
- (3) 시험물질농도로부터 실제투여량 환산
- (4) 사료 및 음용수 성적서
- (5) 독성 평가방법
- (6) 시험물질 처리(투여)와 조직시료채취에 관한 세부적인 일정
- (7) 양성 및 음성 판정기준
- (8) 시험계획서의 이탈사항. 그 이탈사항이 시험계획과 결과에 어떤 영향을 주었는지에 관한 설명

(9) ELISA 키트의 출처, 로트 번호, 제조자의 품질보증 자료

2.8 신뢰성 확인

- (1) 양성대조물질, 음성대조물질, 시험물질, 농도 및 용매에 관한 정보를 포함하여 가장 최근에 시행한 신뢰도 확인결과의 요약
- (2) 동시양성대조물질, 주기적 양성대조물질, 음성대조물질(용매/부형제대조군)에 대한 자료
- (3) 동시양성대조물질을 사용하지 않았을 경우, 가장 최근의 주기적 양성대조물질에 대한 실험실 보고서와 날짜, 동시양성대조물질을 사용하지 않는 사유에 대한 정당성을 설명할 수 있는 과거양성대조물질에 대한 보고서

2.9 결과

- (1) 각 마우스의 투여시작일과 부검일의 체중, 각 처리군의 체중 평균과 편차(예, SD, SEM)
- (2) 각 동물에 대한 투여부위에서의 피부자극성을 포함하여 독성이 있으면 독성이 발현이 시작된 시점과 경과
- (3) 마우스 개체별 BrdU 표지지수 및 각 투여군에 대한 SI 값의 표
- (4) 각 투여군의 BrdU 표지지수 평균 및 편차 값(예, SD, SEM), 그리고 개별 동물 처리방식의 결과에서 이상치(outlier)에 대한 분석결과
- (5) 산출된 SI 값 및 개별동물 처리방식을 사용했을 때 시험물질 처리군과 대조군에서의 동물 간 차이를 고려한 변수의 측정방법
- (6) 용량-반응관계
- (7) 통계학적 분석방법

2.10 결과의 토의

시험물질이 과민성물질인지에 대한 결론과 함께 결과값, 용량-반응분석, 통계분석 등에 대한 간단한 의견

나. BrdU-FCM 시험법

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 림프구 중의 BrdU(비방사성물질 5-브로모-3-데옥시우리딘) 함량분석을 통해 림프구 증식을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 용어 정의

2.1 피부과민성(Skin sensitization)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2 자극지수(SI, Stimulation Index)

시험물질의 피부과민반응성 정도를 평가하기 위해 계산된 값. 시험물질 처리군의 림프구 증식 값을 음성대조물질의 림프구 증식 값으로 나눈 값

II. 시험

1. 원리

시험물질이 도포 부위에 가까운 림프절 내 림프구의 증식을 유도하는 정도에 따라 피부과민성이 평가된다. 림프구증식은 BrdU가 세포의 DNA에 얼마나 유입되었는지에 따라 평가되는데, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC, Fluorescein Isothiocyanate)로 표지된 BrdU 특이항체와 유세포분석기를 이용한다(FCM, Flow Cytometry Method). 용매대조군의 림프구 증식에 대한 시험물질 처리군의 림프구 증식 비율로서 자극지수를 결정하며 이때 자극지수가 2.7 이상인 경우를 과민성 물질로 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

(1) 일반적으로 BALB/c 계통의 마우스를 사용한다. CBA/J 계통의 마우스도 사용 가능하며 BALB/c 계통과 연관성(관련성)이 높고 더 민감하다. 동물종에 따른 자극지수 기준값은 다를 수 있다.

(2) 출산경험이 없거나 비임신 상태인 생후 8 주령 ~ 12 주령의 건강한 암컷을 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다. 정당한 이유가 있으면 다른 동물을 이용해도 무관하다. 시험 시작과 부검 전에는 체중을 측정한다.

(3) 실험동물을 집단으로 사육하며 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 되도록 유지한다. 사육실 청소시간 이외에는 가능한 습도를 50 % ~ 60 %로 조절해야 한다. 사료는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음용수와 함께 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.

(4) 동물은 무작위로 선별하고, 개체식별을 위한 표식을 하되 귀 부위에는 표식 처리를 하지 않는다. 실험실 조건에 순화되도록 최소한 투여개시 5 일 전부터 케이지에 순화시킨다. 시험물질 처치 시작 전에 모든 동물에서 피부병변이 없는 것을 확인해야 한다.

2.2 시험물질

고체시험물질을 적당한 부형제(용매)에 용해 또는 현탁시키고, 마우스의 귀에 도포하기 전에 적절히 희석해야 한다. 액체시험물질은 도포하기 전에 적절히 희석한다. 보존기간에 대한 안정성자료가 확보되지 않는 한, 시험물질은 사용할 때마다 매일 조제한다.

3. 시험 방법

3.1 신뢰성 확인

이 시험을 실행하는 시험기관의 신뢰도 확인을 위해 반드시 양성대조물질과

음성대조물질을 사용하여 그 반응을 확인해야 한다. 양성대조물질은 25 % 헥실 신나믹알데히드(Hexylcinnamicaldehyde, CAS 번호 101-86-0)와 25 % 유제놀(Eugenol, CAS 번호 97-53-0)이며 아세톤과 올리브오일의 4 : 1 (v/v) 혼합용매에 녹인 것을 권장한다. 양성대조물질은 음성대조물질에 대해 자극지수가 2.7 이상 ($SI \geq 2.7$) 나타나야 한다. 양성대조물질의 투여량은 과도한 피부자극 또는 전신 독성을 유발하지 않아야 하며 자극지수가 27을 초과하지 않는 범위에서 선정 되어야 한다.

3.2 동물의 수와 투여용량

(1) 최소 3개 용량이 설정되어야 하며 투여용량 당 최소 4 마리의 동물이 사용 되어야 한다. 여기에 양성대조군과 음성대조군이 추가된다. 연속적인 투여용량은 일반적으로 100 %, 50 %, 25 %, 10 %, 5 %, 2.5 %, 1 %, 0.5 % 등과 같은 적절한 농도계열로부터 선택된다.

(2) 국소피부자극과 전신독성이 과도하게 나타나는 용량을 피하면서 노출이 극대화될 수 있도록 용량선택을 해야 한다. 이러한 정보가 존재하지 않는다면, 본 시험의 용량 결정을 위한 예비시험이 필요하다.

3.3 용매의 선택

시험결과를 방해하거나 결과를 편향되게 만들지 않고, 시험물질을 실험동물에 처리하기에 적절한 용액/현탁액을 만들면서 고농도를 얻을 수 있도록 용해도를 극대화 시킬 수 있는 것을 선택한다. 아세톤 : 올리브유(4 : 1, v/v), N, N-디메틸 포름아마이드, 메틸에틸케톤, 프로필렌글리콜과 디메틸설폭사이드 등을 사용할 수 있다.

3.4 예비시험

(1) 전신독성 및 과도한 국소피부자극성을 나타내지 않는 본 시험의 최고농도를 결정하기 위해 수행한다. 림프절 증식을 평가하지 않고 투여군 당 마릿수가 적다는 점이 본 시험과 다르다. 본 시험과 같은 조건으로 시험물질을 도포한다.

예비시험의 최고농도는 시험물질이 액체일 경우에는 100 % 원액이어야 하며 고체나 현탁액의 경우 조제가 가능한 최대 농도여야 한다.

(2) 실험동물은 투여군 당 1 마리 혹은 2 마리를 사용한다. 모든 마우스에 대해 전신독성 및 국소반응 등 시험물질 노출에 따른 임상 증상을 매일 관찰한다. 체중은 시험 전과 시험 종료 전날(6 일차) 기록한다.

(3) 각 마우스의 양쪽 귀 모두 홍반 발생 여부를 매일 관찰하고, 표 1의 홍반점수를 바탕으로 점수를 매긴다. 두께측정기를 통해 1 일차(예비 투여), 3 일차(1 일차 투여 후 48 시간), 6 일차에 귀의 두께를 측정한다. 어느 날이든 3 이상의 홍반점수가 나오거나 귀의 두께가 25 % 이상으로 증가하는 경우에는 과도한 국소피부자극으로 볼 수 있다.

(4) 본 시험에서 사용할 최고농도는 예비시험에서 전신독성과 과도한 국소피부 자극성을 보이지 않는 농도 중 최고농도로 정한다.

표 1. 홍반 점수

관찰 결과	점수
홍반이 없을 경우	0
매우 약한 홍반이 나타날 경우(겨우 인지될 정도)	1
홍반이 명확하게 나타난 경우	2
중증도에서 심각한 상황의 홍반	3
심각한 홍반(적홍색)에서 홍반의 등급을 매기기 어려울 정도의 가피가 생기는 수준	4

3.5 본시험

3.5.1 일정별 수행절차

(1) 1 일차

각 동물의 체중과 임상 관찰결과를 개체별로 확인하고 기록한다. 각 희석배율로 제조한 시험물질, 용매(음성대조물질), 양성대조물질 25 μ L를 마우스 귓등에 1 회 도포한다.

(2) 2 일차 및 3 일차

1 일차 수행한 것과 같은 방법으로 각각의 해당 물질을 도포한다.

(3) 4 일차

모든 동물에 대해 도포과정을 시행하지 않는다.

(4) 5 일차

BrdU(20 mg/mL)용액 0.1 mL를 복강에 주입한다(2 mg/mouse).

(5) 6 일차

각 동물의 체중 및 임상관찰결과를 기록한다. BrdU를 주입한 지 24 시간 후, 인도적으로 동물을 안락사시킨다. 각 마우스의 양쪽 림프절을 절제하고 각각을 인산완충생리식염수(PBS)에 처리한다.

3.5.2 세포부유액의 조제

각 동물의 좌우 귀로부터 얻은 림프절로부터 단일세포를 유리시켜 부유액을 만든다. 이때, 200 μ m의 스테인리스 철망 등을 이용한다. 림프절 세포를 차가운 인산완충생리식염수(예, 2 mL)로 세포 부유액을 만들고 희석한다(예, 10 배). 세포증식에는 1.5×10^6 개의 세포가 필요하다.

3.5.3 세포증식측정(BrdU-양성 림프구 측정)

BrdU-양성 림프구는 상용화된 키트를 사용하여 FCM을 통해 계수된다. LNC (Lymph Node Cells) 부유액(1.5×10^6)을 인산 완충생리식염수(PBS)로 1 회 세척한 다음 재현탁 시킨 뒤, 키트와 함께 제공된 완충액으로 세포를 투과시키고 DNase를 처리한다. 세척 후 FITC-conjugated anti-BrdU 항체를 첨가하고, 세척 후 7-아미노엑티노마이신 D(7-AAD) 용액을 첨가한다. 생존 가능한 7-AAD 발현 세포 집단(10^4 세포) 내의 BrdU- 양성 세포의 수를 유세포 분석기로 계수한다.

3.5.4 일반증상

시험물질 도포부위의 국소자극, 전신독성 등에 대한 임상적 관찰을 적어도 하루에 한 번 주의 깊게 관찰하고 체계적으로 기록한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 각 실험군의 결과는 자극지수(SI)로 나타낸다. LLNA: BrdU-FCM에 대한 SI는 시험물질 처리군 혹은 양성대조군의 마우스 당 BrdU-양성 LNC를 용매/용매대조군의 평균 BrdU-양성 LNC 수로 나눈 값이다. 용매대조군의 평균 SI 값은 1이다. BrdU-양성 LNC의 수는 다음과 같이 계산한다.

$$\text{BrdU-양성 LNC의 수} = \text{BrdU-양성 세포 \%}(Q2 \text{ \%}) \times \text{LNC의 수}$$

*Q2 %; 유세포 분석기 분석에서 “사분면 통계”의 게이트 백분율 자료를 말함.

1.2 SI 값이 2.7 이상일 때($SI \geq 2.7$) 그 시험물질은 양성으로 판정한다. 그러나 경계값에 존재하는 결과가 양성인지 아닌지를 결정할 때에는 용량-반응의 관계, 전신독성 또는 심각한 자극성, 통계적 유의성 등의 추가적인 정보를 고려하여 판단한다.

1.3 각 단계에서 관찰한 각 동물의 피부반응을 보여주는 결과는 표로 정리한다.

2. 시험결과의 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함돼야 한다.

2.1 시험물질

- (1) 출처, 로트 번호, 사용기한 날짜(알려진 경우)
- (2) 시험물질의 안정성(알려진 경우)

2.2 단일조성물질

- (1) 물리적 외관, 수용성 및 추가적인 물리 화학적 특성;
- (2) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드와 같은 화학적 식별, 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 실현 가능한 불순물의 화학적 식별 등

2.3 다조성물질, UVCBs (Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질

- (1) 성분의 화학적 동일성, 정량적 발생 및 관련 물리 화학적 특성에 대한 가능한 한 많은 것

2.4 대조군 (Controls)

- (1) 물질자료(CAS 번호, 출처, 순도; 알려진 불순물; 로트 번호)
- (2) 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도)

2.5 용매(부형제)

- (1) 종류 및 선정근거
- (2) 물질자료(순도, 농도, 사용부피)

2.6 실험동물

- (1) BALB/c 혹은 CBA/J 마우스의 출처
- (2) 동물의 수, 주령 및 성별
- (3) 동물의 공급처, 사육조건, 사료 등
- (4) 동물의 미생물학적 감염 상태(알려진 경우)

2.7 시험조건

- (1) 투여용량 선정근거
- (2) 시험물질의 조제 및 투여의 세부사항
- (3) 시험물질농도로부터 실제투여량 환산
- (4) 사료 및 음용수 성적서
- (5) 독성 평가방법
- (6) 시험물질 처리(투여)와 조직시료채취에 관한 세부적인 일정
- (7) 양성 및 음성 판정기준
- (8) 시험계획서의 이탈사항. 그 이탈사항이 시험계획과 결과에 어떤 영향을 주었는지에 관한 설명
- (9) FCM 키트의 출처, 로트 번호, 제조자의 품질보증 자료

2.8 신뢰성 확인의 결과

- (1) 양성대조물질, 음성대조물질, 시험물질, 농도 및 용매에 관한 정보를 포함하여 가장 최근에 시행한 신뢰도 확인결과의 요약
- (2) 동시양성대조물질, 주기적 양성대조물질, 음성대조물질(용매/부형제대조군)에 대한 자료
- (3) 동시양성대조물질을 사용하지 않았을 경우, 가장 최근의 주기적 양성대조물질에 대한 실험실 보고서와 날짜, 동시양성대조물질을 사용하지 않는 사유에 대한 정당성을 설명할 수 있는 과거양성대조물질에 대한 보고서

2.9 결과

- (1) 각 마우스의 투여시작일과 부검일의 체중, 각 처리군의 체중 평균과 편차 (예, SD, SEM)
- (2) 각 동물에 대한 투여부위에서의 피부자극성을 포함하여 독성이 있으면 독성이 발현이 시작된 시점과 경과
- (3) 마우스 개체별 BrdU-양성 LNC 수 및 각 투여군에 대한 SI 값의 표
- (4) 각 투여군의 BrdU-양성 LNC/마우스 수 평균 및 편차 값(예, SD, SEM), 그리고 개별동물 처리방식의 결과에서 이상치(outlier)에 대한 분석결과
- (5) 산출된 SI 값 및 개별동물 처리방식을 사용했을 때 시험물질 처리군과 대조군에서의 동물 간 차이를 고려한 변수의 측정방법
- (6) 용량-반응관계
- (7) 통계학적 분석방법

2.10 결과의 토의

시험물질이 과민성물질인지에 대한 결론과 함께 결과값, 용량-반응분석, 통계 분석 등에 대한 간단한 의견

제36항 화학적 피부과민성시험(펩티드결합성시험, 아미노산유도체 결합성시험)

가. 펩티드결합성시험(DPRA, Direct Peptide Reactivity Assay)

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 시험물질과 모델펩티드와의 결합반응도를 분석함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 용어 정의

2.1. 피부과민성(Skin sensitivity)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

II. 시험

1. 원리

이 시험법의 기본원리는 화학물질과 단백질 사이의 반응(DPRA, Direct Peptide Reactivity Assay)이 피부과민반응의 초기 단계에 중요하게 기여한다는 것이다. 이 시험법은 시험물질과 2 종류의 모델펩티드(시스테인-펩티드 또는 라이신-펩티드)를 각각 22.5 °C ~ 30 °C, 24 시간 동안 반응시킨 후에 시스테인-펩티드 또는 라이신-펩티드의 잔류농도를 정량하는 화학적(*in chemico*)시험법이다. 시스테인-펩티드와 라이신-펩티드의 소실률을 계산하고 그 값에 따라 과민성물질과 비과민성물질을 판정하게 된다. 이 시험법 단독으로 과민성등급결정 및 안전성평가에 활용하는 것은 완전하지 않으며, 따라서 다른 시험법과 함께 보조적으로 통합평가(IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment) 및 정의된 접근법(DA, Defined Approach)방법을 적용할 필요가 있다.

2. 시험의 준비

2.1. 시스테인-펩티드 및 라이신-펩티드

순도 > 90 %의 시스테인-펩티드(Ac-RFAACAA-COOH) 및 라이신-펩티드(Ac-RFAAKAA-COOH)의 저장용액은 시험물질과 혼합반응 시키기 직전에 새로 제조하여 사용한다. 시스테인-펩티드는 pH 7.5의 인산완충액에서 0.667 mM로, 라이신-펩티드는 pH 10.2의 아세트산암모늄완충액에서 0.667 mM로 조제한다.

2.2. 시험물질

펩티드의 안정성에 영향을 주지 않는 용매(부형제)를 사용하여 100 mM 농도로 조제하며 시험물질을 녹인 용액은 육안으로 보기에 투명해야 한다. 아세토니트릴, 물, 물과 아세토니트릴의 1 : 1 혼합물, 이소프로판올, 아세톤, 또는 아세톤과 아세토니트릴의 1 : 1 혼합물 등이 적절한 용매(부형제)로 권장된다.

2.3. 양성대조물질

신나믹알데히드(Cinnamicaldehyde, CAS 번호 104-55-2, ≥ 95 % 순도)를 아세토니트릴에 100 mM 농도로 용해한 것을 사용한다.

2.4. 표준참조물질(주 1 참고)

표준참조물질은 시험물질을 제외하고 용매(부형제)와 펩티드만을 혼합한 용액으로서 아래와 같은 용도에 사용된다. 권장하고 있는 표준참조물질의 목록은 부록에 제시하였다.

- (1) 전체분석 전에 HPLC 분석시스템의 적합성을 확인하는 데 사용(표준참조물질 A)
- (2) 시간경과에 따른 표준참조물질의 안정성을 확인하는 데 사용(표준참조물질 B)
- (3) 시험물질용해에 사용된 용매가 펩티드소실률에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하기 위해 사용(표준참조물질 C)

2.5. 동시용출대조물질

라이신-펩티드 또는 시스테인-펩티드와 함께 시험물질이 동시에 용출될 가능성을

검출하기 위해 사용하며, 분석대상 반응물 각각에 대해 시험물질만을 단독으로 조제한 용출대조물질을 동시에 분석에 포함해야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시스테인-펩티드 및 라이신-펩티드용액과 시험물질의 혼합반응

- (1) 시스테인-펩티드 및 라이신-펩티드용액은 각각 1 : 10, 1 : 50 비율로 시험물질과 혼합반응 시킨다. 이때, 화학물질 용해도로 인해 침전이 관찰되지 않는 것을 확인하여야 한다.
- (2) 혼합반응은 유리재질의 바이알에서 시행한다.
- (3) 반응용액은 HPLC 분석을 실행하기 전에 22.5 °C ~ 30 °C 암소에서 24 시간 ± 2 시간 동안 반응시킨다.
- (4) 각 시험물질은 시스테인-펩티드 및 라이신-펩티드에 대해 3 번 반복분석을 수행한다.
- (5) HPLC 시행 전, 시료에서 육안으로 침전물이 발견되거나 상 분리가 일어나는 경우 필요시 저속(100 X g ~ 400 X g)으로 원심분리하고 바이알 바닥의 침전물을 제거한다. 이러한 경우 위음성 결과가 나오지 않는지 유의한다.

3.2. HPLC 표준검량선 작성

- (1) 펩티드저장용액(Stock solution, 0.667 mM)에 대해 계열희석방법을 사용하여 0.0167 mM ~ 0.534 mM 농도범위에 해당하는 6 개 농도의 표준용액을 제조한다.
- (2) 희석용 완충액만을 사용한 Blank용액도 표준반응곡선에 포함되도록 한다.

3.3. HPLC 준비와 분석

- (1) 분석을 하기 전 최소 2 시간 동안 적절한 용매로 HPLC 시스템을 평형상태로 만든다.
- (2) HPLC 분석은 0.35 mL/min의 유속으로, 선형농도구배로 10 %에서 25 %로 아세트니트릴용액농도를 증가시키면서 10 분간 수행한다. 유속 또는 선형농도구배 등은 시험조건에 따라 적절히 조절 가능하다.

- (3) 각 표준용액과 분석대상시료 및 대조물질 모두 같은 부피로 컬럼에 주입한다.
매 시료를 주입하기 전에 컬럼을 재평형(Re-equilibrated) 시킨다.
- (4) 흡광도는 220 nm에서 측정한다. 광다이오드어레이검출기를 사용하는 경우, 258 nm에서의 흡광도를 측정한다.
- (5) HPLC 분석은 펩티드용액과 시험물질의 혼합반응 후 22 시간 ~ 26 시간 후에 첫 번째 시료를 주입할 수 있도록 시간을 정확히 지켜야 한다.
- (6) HPLC 분석은 전체분석이 최대 30 시간 이내에 실행될 수 있도록 분석시간을 설정해야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 각 반응시료의 시스테인-펩티드 또는 라이신-펩티드의 농도를 220 nm 파장에서 측정하며, 해당 피크의 면적(곡선아래면적, AUC)을 측정한 후 펩티드의 표준곡선에 대입하여 각 반응시료 내의 펩티드농도를 산출한다.
- 1.2. 펩티드소실률은 각 피크의 면적을 측정한 후 아래의 식에 따라 표준참조물질 C(주 1 참고)의 평균 피크면적으로 나누어 계산한다.

펩티드소실률(%)

$$= [1 - (\text{펩티드 피크 면적} / \text{표준참조물질 C의 펩티드의 평균 피크 면적})] \times 100$$

2. 시험의 성립조건

- 2.1. HPLC 측정을 유효한 것으로 간주하려면 다음과 같은 조건을 충족하여야 한다.
 - (1) 표준검량선의 R^2 은 0.99보다 커야 한다.
 - (2) 양성대조물질인 신나믹알데히드에 대한 3 번 반복 측정 값의 평균 펩티드 소실률 결과가 다음과 같아야 한다.

시스테인-펩티드: 60.8 % ~ 100 % (표준편차 14.9 % 미만)

라이신-펩티드: 40.2 % ~ 69.0 % (표준편차 11.6 % 미만)

- (3) 표준참조물질 A의 평균 펩티드농도는 $0.50 \text{ mM} \pm 0.05 \text{ mM}$ 이어야 하며, 아세토니트릴에 용해한 9 종의 표준참조물질 B와 C의 펩티드 피크 면적의 변동계수(CV)는 15.0 % 미만이어야 한다.

위 기준 중 하나라도 충족되지 않으면 다시 시험하여야 한다.

2.2. 시험물질에 대한 결과가 유효하려면 다음 사항이 만족되어야 한다.

- (1) 시험물질의 반복측정에 대한 최대 표준편차는 시스테인-펩티드소실률에서는 14.9 % 미만, 라이신-펩티드소실률에서는 11.6 % 미만이어야 한다.
- (2) 3 개의 표준참조물질 C의 평균 펩티드농도는 $0.50 \text{ mM} \pm 0.05 \text{ mM}$ 이어야 한다.

위 기준을 만족하지 않으면 시험결과를 폐기하고 다시 시험하여야 한다.

3. 판정

- 3.1. 각 시험물질에 대해 시스테인-펩티드 소실률 및 라이신-펩티드 소실률을 계산한다. 평균을 계산할 때 음의 소실률 값은 “0” 으로 간주한다. 표 1에 제시된 수치를 기반으로 예측판정을 수행한다. 단, 이러한 예측은 오로지 화학물질의 단백질 반응성만으로는 과민성판단의 기준이 되기 어렵다는 것을 전제로 한다.

표 1. 시스테인 1 : 10/라이신 1 : 50 예측모델

시스테인 및 라이신 평균 소실률(%)	반응등급	DPRA예측
$0 \% \leq \text{평균 소실률} \leq 6.38 \%$	무반응 또는 최소한의 반응	음성
$6.38 \% < \text{평균 소실률} \leq 22.62 \%$	낮은 반응	양성
$22.62 \% < \text{평균 소실률} \leq 42.47 \%$	일반적인 반응	
$42.47 \% < \text{평균 소실률} \leq 100 \%$	높은 반응	

3.2. 시험물질 자체가 220 nm 파장을 흡수하여 피크에 영향을 주는 동시용출이 시스테인-펩티드와 라이신-펩티드 모두에서 발생하게 되면 분석결과는 “결론미정”으로 보고한다. 동시용출이 라이신-펩티드에 대해서만 발생한 경우에는 표 2에 보고된 시스테인 1 : 10에 따른 예측모델을 사용할 수 있다.

표 2. 시스테인 1 : 10 예측모델

시스테인 소실률(%)	반응등급	DPRA예측
0 % ≤ 평균소실률 ≤ 13.89 %	무반응 또는 최소한의 반응	음성
13.89 % < 평균소실률 ≤ 23.09 %	낮은 반응	양성
23.09 % < 평균소실률 ≤ 98.24 %	일반적인 반응	
98.24 % < 평균소실률 ≤ 100 %	높은 반응	

3.3. 펩티드와 시험물질 간의 용출시간이 부분적으로 겹치는 경우에 시스테인 1 : 10/라이신 1 : 50 예측모델에 안에서 펩티드소실률(%)을 추정하여 그 값을 사용한다. 이 경우, 반응등급 산정은 정확하지 않을 수 있다.

3.4. 시스테인 1 : 10/라이신 1 : 50 예측모델에서 평균 소실률(%)이 3 % ~ 10 % 범위에 존재하거나, 시스테인 1 : 10 예측모델에서 시스테인소실률(%)이 9 % ~ 17 % 범위에 존재하게 되면 재시험을 수행한다.

4. 시험결과의 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다.

4.1. 시험물질

4.1.1. 단일조성물질

(1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보

- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(가능한 범위에서)
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

4.1.2. 다조성물질

- (1) 물질의 특성 정보, 식별정보, 순도, 함유량, 물리·화학적 성질(가능한 범위에서)
- (2) 물리적 외관, 수용해도, 추가 관련 물리·화학적 성질(가능한 범위에서)
- (3) 분자량, 그 구성성분이 알려진 혼합물질/폴리머의 경우 외관분자량, 또는 시험 수행과 관련된 다른 정보
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

4.2. 대조군

4.2.1. 양성대조물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (2) 물리적 외관, 수용해도, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하고 거의 실현가능한 범위에서)
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)
- (7) 시험의 승인기준에 적절하였음을 증명하는 과거의 양성대조물질 시험결과에 대한 참고문헌

4.2.2. 용매보조제

- (1) 용매/보조제 및 성분의 함량비(해당되는 경우)
- (2) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하고 거의 실현가능한 범위에서)
- (4) 물리·화학적 특성(물리적 외관, 수용해도)
- (5) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)
- (6) 각 시험물질에 대한 용매선정의 정당성
- (7) 아세트니트릴용매의 경우 펩티드안정성에 미치는 영향

4.3. 펩티드, 양성대조물질 및 시험물질 조제

- (1) 펩티드용액의 특성(공급자, 로트 번호, 펩티드의 정확한 무게, 저장용액에 첨가된 부피)
- (2) 양성대조물질의 특성(정확한 중량, 시험용액에 대해 첨가된 부피)
- (3) 시험물질의 특성(정확한 중량, 시험용액에 대한 첨가된 부피)

4.4. HPLC 기기 설정 및 분석

- (1) HPLC 기기 형태, HPLC, 가드컬럼, 검출기, 자동시료주입기 종류
- (2) 컬럼온도, 주입량, 유속, 농도구배 등 HPLC 분석에 대한 중요한 매개변수

4.5. 시스템 적정성

- (1) 각 표준물질 및 표준참조물질 A의 반복에 대한 220 nm에서 펩티드의 피크 면적
- (2) 선형표준곡선그래프, R^2 값
- (3) 각 표준참조물질 A 반복에 대한 펩티드농도
- (4) 3 종 표준참조물질 A에 대한 평균 피크농도(mM), SD와 CV
- (5) 표준참조물질 A 및 C에 대한 펩티드농도

4.6. 분석절차

4.6.1. 표준참조물질

- (1) 표준참조물질 B와 표준참조물질 C 각각의 반복에 대한 220 nm에서의 펩티드 피크 면적
- (2) 아세토니트릴에 용해시킨 9 종의 표준참조물질 B와 C의 220 nm에서의 펩티드 피크 면적 평균 값, SD 및 CV (분석시간경과에 따른 표준참조물질의 안정성에 대한)
- (3) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 표준참조물질 C의 (펩티드소실률 계산을 위해) 220 nm에서의 평균 펩티드 피크 면적
- (4) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 표준참조물질 C의 펩티드농도(mM)
- (5) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 적절한 표준참조물질 C의 펩티드농도(mM)의 평균 값, SD 및 CV

4.6.2. 양성대조물질

- (1) 각 반복에 대한 220 nm에서의 펩티드 피크 면적
- (2) 각 반복의 펩티드소실률(%)
- (3) 3 반복에 대한 평균 펩티드소실률(%) 평균, SD 및 CV

4.6.3. 시험물질

- (1) 배양기간 종료 후 반응액 혼합물에서의 침전물 성상(관측될 경우). 침전물이 다시 가용화되었는지, 원심분리 시 침전 되었는지의 여부
- (2) 동시용출 여부
- (3) 다른 관련 관측사항(해당하는 경우)
- (4) 각 반복의 220 nm에서의 펩티드 피크 면적
- (5) 각 반복의 펩티드소실률(%)
- (6) 3 반복에 대한 평균 펩티드소실률(%), SD 및 CV
- (7) 시스테인-펩티드소실률(%) 평균 및 라이신-펩티드소실률(%)
- (8) 사용한 예측모델과 DPRA예측

4.7. 숙련도 시험

(해당하는 경우) 시험방법을 수행하면서 실험실의 숙련도를 보여줄 수 있는 절차 (예, 숙련도 물질에 대한 시험 등^{주2)}, 또는 시간경과에 따라 시험방법의 재현성을 보여주는 절차 등

4.8. 결과의 토의

- (1) DPRA시험방법과 함께 얻어진 결과를 토론
- (2) 다른 관련 정보가 이용 가능할 경우 통합평가의 맥락에서 시험방법 결과를 토론

4.9. 결론

부록 1

숙련도 확인 시험물질

화학적 피부과민성: 펩티드결합성 분석

이 시험방법을 일상적으로 사용하기 전에 먼저 해당 실험실은 표 1에서 추천하는 10 종의 숙련도 확인 시험물질을 사용하여, DPRA예측과 판정이 일치하는 결과를 도출해야 한다. 또한, 10 종 숙련도물질 중 8 종에 의한 시스테인과 라이신의 소실률(%)이 각각의 기준범위 이내라는 것을 확인함으로써 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

표 1. 펩티드결합성시험(DPRA법) 숙련도 입증을 위한 권장 표준물질

숙련도물질	CAS 번호	물리적 상태	생체 내 판정	DPRA 판정	시스테인-펩티드 소실률 범위	라이신-펩티드 소실률 범위
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	과민성물질 (극심한)	양성	90 ~ 100	15 ~ 45
Oxazolone	15646-46-5	고체	과민성물질 (극심한)	양성	60 ~ 80	10 ~ 55
Formaldehyde	50-00-0	액체	과민성물질 (강한)	양성	30 ~ 60	≤ 24
Benzylideneacetone	122-57-6	고체	과민성물질 (중간)	양성	80 ~ 100	≤ 7
Farnesal	19317-11-4	액체	과민성물질 (약한)	양성	15 ~ 55	≤ 25
2,3-Butanedione	431-03-8	액체	과민성물질 (약한)	양성	60 ~ 100	10 ~ 45
1-Butanol	71-36-3	액체	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 5.5
6-Methylcoumarin	92-48-8	고체	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 5.5
Lactic Acid	50-21-5	액체	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 5.5
4-Methoxyacetophenone	100-06-1	고체	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 5.5

부록 2

분석순서의 예

검량선과 표준참조물질 A	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Dilution buffer 표준참조물질 A, 반복 1 표준참조물질 A, 반복 2 표준참조물질 A, 반복 3
동시용출대조물질	시험물질 1에 대한 동시용출대조물질 1 시험물질 2에 대한 동시용출대조물질 2
표준참조물질 B	표준참조물질 B, 반복 1 표준참조물질 B, 반복 2 표준참조물질 B, 반복 3
첫 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 1 신나믹알데히드(Cinnamicaldehyde), 반복 1 시료1, 반복 1 시료2, 반복 1
두 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 2 신나믹알데히드(Cinnamicaldehyde), 반복 2 시료1, 반복 2 시료2, 반복 2
세 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 3 신나믹알데히드(Cinnamicaldehyde), 반복 3 시료1, 반복 3 시료2, 반복 3
표준참조물질 B	표준참조물질 B, 반복 4 표준참조물질 B, 반복 5 표준참조물질 B, 반복 6

- 표준참조물질은 각 분석절차에 3 세트(예, 적절한 용매에 용해된 펩티드만으로 구성된 시료)를 포함하도록 한다.
- 표준참조물질 A: HPLC 시스템의 적합성을 확인하기 위해 사용
- 표준참조물질 B: 분석시간 동안 표준참조물질의 안정성을 검증하기 위해 분석절차의 처음과 나중에 사용
- 표준참조물질 C: 시험물질용해에 사용되는 용매가 펩티드소실률(%)에 영향을 주지 않는다는 것을 입증하기 위해 사용

나. 아미노산유도체 결합성시험(ADRA, Amino acid Derivative Reactivity assay)

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 시험물질과 아미노산유도체와의 결합반응도를 분석함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는 데 있다.

2. 용어 정의

2.1. 피부과민성(Skin sensitivity)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

II. 시험

1. 원리

이 시험법은 시험물질과 2 종류의 아미노산 유도체인 N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-cysteine (NAC, CAS 번호 32668-00-1) 및 α -N-(2-(1-naphthyl)acetyl)-L-lysine (NAL, CAS. 397841-92-8)를 각각 25 °C \pm 1 °C, 24 시간 \pm 1 시간 동안 반응시킨 후에 NAC 및 NAL의 상대농도를 281 nm에서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, High-Performance Liquid Chromatography)로 측정한다. NAC 및 MAL의 소실률을 계산하고 그 값에 따라 과민성물질과 비과민성물질을 판정하게 된다. 이 시험법 단독으로 과민성등급결정 및 안전성평가에 활용하는 것은 완전하지 않으며, 따라서 다른 시험법과 함께 보조적으로 통합평가(IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment)방법을 적용할 필요가 있다.

2. 시험의 준비

2.1. NAC 및 NAL의 품질

순도 > 98 %의 NAC 및 NAL 저장용액을 사용하여 대조군을 준비하고, 조제 직후

(0 시간) 및 24 시간 후에 NAC 및 NAL의 잔류 수준을 정량화 하여 안정성을 확인한다. NAC 및 NAL의 잔류 수준은 최소 90 %여야 한다. NAC의 잔류 수준은 NAC의 합에 대한 NAC이량체의 잔류수준의 백분율로 계산된다. NAC 및 NAL을 부록 1에 제시된 10 종의 숙련도 물질과 반응시켰을 때 해당하는 반응 결과를 보일 때 비로서 본 실험이 적절하게 수행될 수 있다고 인정된다.

2.2. NAC 및 NAL의 저장용액

NAC 저장용액은 EDTA 0.333 μ M이 함유된 100 mM의 pH 8.0 인산완충액에서 2 mM로, NAL 저장용액은 100 mM의 pH 10.2 인산완충액에서 2mM로 조제한다.

2.3. 시험물질

시험물질의 적절한 용매로는 증류수, 아세토니트릴 및 아세톤 등이다. 시험물질이 앞의 용매 중 어느 것에도 용해되지않으면, 시험물질을 DMSO(DiMethylSulfOxide)에 용해시킨 다음 아세토니트릴로 20배 희석하여 1mM의 농도로 제조 한다.

2.4. 양성대조물질

페닐아세트알데히드(Phenylacetaldehyde, CAS 122-78-1, \geq 90 % 순도)를 아세토니트릴에 1 mM 농도로 용해한 것을 사용한다.

2.5. 표준참조물질(주 2 참고)

표준참조물질은 시험물질을 제외하고 용매(부형제)와 NAC 및 NAL을 혼합한 용액으로서 아래와 같은 용도에 사용된다. 권장하고 있는 표준참조물질의 목록은 부록에 제시하였다.

- (1) 전체분석 전에 HPLC 분석시스템의 적합성을 확인하는 데 사용(표준참조물질 A)
- (2) 시간경과에 따른 표준참조물질의 안정성을 확인하는 데 사용(표준참조물질 B)
- (3) 시험물질용해에 사용된 용매가 NAC 및 NAL의 소실률에 영향을 주지 않는다는 것을 확인하기 위해 사용(표준참조물질 C)

2.6. 동시용출대조물질

NAC 및 NAL와 함께 시험물질이 동시에 용출될 가능성을 검출하기 위해 사용하며, 분석대상 반응물 각각에 대해 시험물질만을 단독으로 조제한 용출대조물질을 동시에 분석에 포함해야 한다.

3. 시험방법

3.1. NAC 및 NAL용액과 시험물질의 혼합반응

- (1) NAC 및 NAL용액은 각각 1 : 50 비율로 시험물질과 혼합반응 시킨다. 이때, 화학물질 용해도로 인해 침전이 관찰되지 않는 것을 확인하여야 한다.
- (2) 혼합반응은 유리재질의 바이알에서 시행한다.
- (3) 반응용액은 HPLC 분석을 실행하기 전에 $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 암소에서 24 시간 \pm 1 시간 동안 반응시킨다.
- (4) 배양 후 반응을 멈추기 위해 트리플루오로아세트산(TFA, TriFluoroacetic Acid, $\geq 98\%$)을 고정용액으로 첨가한다.

3.2. HPLC 준비와 분석

- (1) 각 시험물질은 NAC 및 NAL에 대해 3 번 반복분석을 수행한다.
- (2) HPLC 시행 전, 시료에서 육안으로 침전물이 발견되거나 상 분리가 일어나는 경우 필요시 저속($100\text{ X g} \sim 400\text{ X g}$)으로 원심분리하고 바이알 바닥의 침전물을 제거한다. 이러한 경우 위음성 결과가 나오지 않는지 유의한다.
- (3) NAC 및 NAL 저장용액(Stock solution, $5.0\text{ }\mu\text{M}$)에 대해 희석용 완충액만을 사용한 Blank용액 및 계열희석방법을 사용하여 $5.0\text{ }\mu\text{M} \sim 0.156\text{ }\mu\text{M}$ 의 농도범위에 해당하는 6 개의 표준용액을 제조하여 표준 검량선을 만든다.
- (4) 분석을 하기 전 최소 두 번 적절한 용매로 HPLC 시스템을 작동시켜 평형상태로 만든다.
- (5) HPLC 분석은 0.30 mL/min 의 유속으로, 선형농도구배로 NAC의 경우 $30\% \sim 55\%$, NAL의 경우 $25\% \sim 45\%$ 로 아세토니트릴용액농도를 증가시키면서 10 분간 수행한다. 유속 또는 선형농도구배 등은 시험조건에 따라 적절히 조절 가능하다.

- (6) 각 표준용액과 분석대상시료 및 대조물질 모두 같은 부피로 컬럼에 주입한다.
매 시료를 주입하기 전에 컬럼을 재평형(Re-equilibrated) 시킨다.
- (7) 흡광도는 281 nm에서 측정한다. 광다이오드어레이검출기를 사용하는 경우,
291 nm에서의 흡광도를 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 각 반응시료의 NAC 및 NAL의 농도를 281 nm에서 측정하며, 해당 피크의 면적
(곡선아래면적, AUC)을 측정한 후 NAC 및 NAL의 표준곡선에 대입하여 각 반
응시료 내의 NAC 및 NAL농도를 산출한다.
- 1.2. NAC 및 NAL의 소실률은 각 피크의 면적을 측정한 후 아래의 식에 따라 표준
참조물질 C(주 2 참고)의 평균 피크면적으로 나누어 계산한다.

NAC 및 NAL소실률(%)

$$= [1 - (\text{NAC 및 NAL 피크 면적} / \text{표준참조물질 C의 NAC 및 NAL의 평균 피크 면적})] \times 100$$

2. 시험의 성립조건

- 2.1. HPLC 측정을 유효한 것으로 간주하려면 다음과 같은 조건을 충족하여야 한다.
 - (1) 표준검량선의 R^2 은 0.990보다 커야 한다.
 - (2) 양성대조물질인 페닐아세트알데히드에 대한 3 번 반복 측정 값의 평균 소실률
결과가 다음과 같아야 한다.
NAC: 6 % ~ 30 % (표준편차 10 % 미만)
NAL: 75 % ~ 100 % (표준편차 10 % 미만)
 - (3) 표준참조물질 A 및 C의 평균 NAC 및 NAL농도는 3.2 μM ~ 4.4 μM 이어야
하며, 아세토니트릴에 용해한 9 종의 표준참조물질 B와 C의 펩티드 피크 면
적의 변동계수(CV)는 10 % 미만이어야 한다.

위 기준 중 하나라도 충족되지 않으면 다시 시험하여야 한다.

2.2. 시험물질에 대한 결과가 유효하려면 다음 사항이 만족되어야 한다.

- (1) 시험물질의 반복측정에 대한 최대 표준편차는 NAC 및 NAL 모두 10 % 미만이어야 한다.
- (2) 3 개의 표준참조물질 C의 평균 NAC 및 NAL농도는 $3.2 \mu\text{M} \sim 4.4 \mu\text{M}$ 이어야 한다.

위 기준을 만족하지 않으면 시험결과를 폐기하고 다시 시험하여야 한다.

3. 판정

- 3.1. 각 시험물질에 대해 NAC 및 NAL 소실률을 계산한다. 평균을 계산할 때 음의 소실률 값은 “0” 으로 간주한다. 표 1에 제시된 수치를 기반으로 예측판정을 수행한다. 단, 이러한 예측은 오로지 화학물질의 단백질 반응성만으로는 과민성 판단의 기준이 되기 어렵다는 것을 전제로 한다.

표 1. NAC/NAL 예측 판정모델

NAC 및 NAL 평균 소실률(%)	판정모델
< 4.9 %	음성
4.9 % ≤	양성

- 3.2. 시험물질 자체가 281 nm 파장을 흡수하여 피크에 영향을 주는 동시용출이 NAC 및 NAL 모두에서 발생하고, 용출시간의 분리가 불가능한 경우 분석결과는 “결론미정” 으로 보고한다. 동시용출이 NAL에 대해서만 발생하고 용출 시간의 분리가 불가능할 경우에는 표 2에 보고된 NAC 단독 예측모델을 사용할 수 있다.

표 2. NAC 단독 판정모델

NAC 평균 소실률(%)	판정모델
< 5.6 %	음성
5.6 % ≤	양성

3.3. NAC/NAL 예측판정모델에서 평균 소실률(%)이 3.0 % ~ 10.0 % 범위에 존재하거나, NAC 단독 예측모델에서 NAC 소실률(%)이 4.0 % ~ 11.0 % 범위에 존재하게 되면 재시험을 수행한다.

4. 시험결과의 보고

시험의 보고에 다음과 같은 정보가 포함되어야 한다.

4.1. 시험물질

4.1.1. 단일조성물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(가능한 범위에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(가능한 범위에서)
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

4.1.2. 다조성물질

- (1) 물질의 특성 정보, 식별정보, 순도, 함유량, 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)
- (3) 알려진 물질의 혼합물 또는 중합체에 대한 분자량(또는 외관 분자량), 또는 연구와 관련된 기타 정보
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)

- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

4.2. 대조군

4.2.1. 양성대조물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하거나 실현가능한 범위에서)
- (4) 시험 전의 전처리 여부(예. 가온, 분쇄)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)
- (7) 시험의 승인기준에 적절하였음을 증명하는 과거의 양성대조물질 시험결과에 대한 참고문헌

4.2.2. 용매

- (1) 용매 및 성분의 함량비(해당되는 경우)
- (2) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (3) 순도, 불순물의 화학적 정보(적절하고 거의 실현가능한 범위에서)
- (4) 용매가 사용될 때의 물리적 외관, 분자량 및 추가적인 관련 물리·화학적 특성(시험방법에서 언급된 것 이외)
- (5) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)
- (6) 각 시험물질에 대한 용매선정의 정당성
- (7) 아세트니트릴용매의 경우 NAC 및 NAL안정성에 미치는 영향

4.3. NAC 및 NAL, 양성대조물질 및 시험물질 조제

- (1) NAC 및 NAL용액의 특성(공급자, 로트 번호, NAC 및 NAL의 정확한 무게, 저장용액에 첨가된 부피)

- (2) 양성대조물질의 특성(정확한 중량, 시험용액에 대해 첨가된 부피)
- (3) 시험물질의 특성(정확한 중량, 시험용액에 대해 첨가된 부피)

4.4. HPLC 기기 설정 및 분석

- (1) HPLC 기기 형태, HPLC, 가드컬럼, 검출기, 자동시료주입기 종류
- (2) 컬럼온도, 주입량, 유속, 농도구배 등 HPLC 분석에 대한 중요한 매개변수

4.5. 시스템 적정성

- (1) 각 표준물질 및 표준참조물질 A의 반복에 대한 281 nm에서 NAC 및 NAL의 피크 면적
- (2) 선형표준곡선그래프, R^2 값
- (3) 각 표준참조물질 A 반복에 대한 NAC 및 NAL농도
- (4) 3 종 표준참조물질 A에 대한 평균 피크농도(μM), SD와 CV
- (5) 표준참조물질 A 및 C에 대한 NAC 및 NAL농도

4.6. 분석절차

4.6.1 표준참조물질

- (1) 표준참조물질 B와 표준참조물질 C 각각의 반복에 대한 281 nm에서의 NAC 및 NAL 피크 면적
- (2) 아세트니트릴에 용해시킨 9 종의 표준참조물질 B와 C의 281 nm에서의 NAC 및 NAL 피크 면적 평균 값, SD 및 CV (분석시간경과에 따른 표준참조물질의 안정성에 대한)
- (3) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 표준참조물질 C의 (NAC 및 NAL소실률 계산을 위해) 220 nm에서의 평균 NAC 및 NAL 피크 면적
- (4) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 표준참조물질 C의 NAC 및 NAL농도(μM)
- (5) 각각 사용된 용액에 대해, 3 종의 적절한 표준참조물질 C의 NAC 및 NAL농도의 평균 값, SD 및 CV

4.6.2. 양성대조물질

- (1) 각 반복에 대한 220 nm에서의 NAC 및 NAL 피크 면적
- (2) 각 반복의 NAC 및 NAL 소실률(%)
- (3) 3 반복에 대한 평균 NAC 및 NAL 소실률(%) 평균, SD 및 CV

4.6.3. 시험물질

- (1) 배양기간 종료 후 반응액 혼합물에서의 침전물 성상(관측될 경우). 침전물이 다시 가용화되었는지, 원심분리 시 침전 되었는지의 여부
- (2) 동시용출 여부
- (3) 다른 관련 관측사항(해당하는 경우)
- (4) 각 반복의 220 nm에서의 NAC 및 NAL 피크 면적
- (5) 각 반복의 NAC 및 NAL 소실률(%)
- (6) 3 반복에 대한 평균 NAC 및 NAL 소실률(%), SD 및 CV
- (7) NAC 소실률(%) 평균 및 NAL 소실률(%)
- (8) 사용한 판정모델

4.7. 숙련도 시험

(해당하는 경우) 시험방법을 수행하면서 실험실의 숙련도를 보여줄 수 있는 절차 (예, 숙련도 물질에 대한 시험 등^{주2)}, 또는 시간경과에 따라 시험방법의 재현성을 보여주는 절차 등

4.8. 결과의 토의

- (1) ADRA시험방법과 함께 얻어진 결과를 토론
- (2) 다른 관련 정보가 이용 가능할 경우 통합평가의 맥락에서 시험방법 결과를 토론

4.9. 결론

부록 1

숙련도 확인 시험물질

화학적 피부과민성: 아미노산유도체 결합성시험

이 시험방법을 일상적으로 사용하기 전에 먼저 해당 실험실은 표 1에서 추천하는 10 종의 숙련도 확인 시험물질을 사용하여, ADRA예측과 판정이 일치하는 결과를 도출해야 한다. 또한, 10 종 숙련도물질 중 8 종에 의한 NAC 및 NAL의 소실률(%)이 각각의 기준범위 이내라는 것을 확인함으로써 기술적 숙련도를 입증해야 한다.

표 1. 아미노산유도체 결합성시험(ADRA법) 숙련도 입증을 위한 권장 표준물질

번호	숙련도물질	CAS 번호	물리적 상태	분자량	생체 내 판정	ADRA 판정	소실률 범위	
							NAC	NAL
1	<i>p</i> -Benzoquinone	106-51-4	고체	108.09	과민성물질 (극심한)	양성	90 ~ 100	40 ~ 70
2	Chloramine T trihydrate	7080-50-4	고체	281.69	과민성물질 (강한)	양성	90 ~ 100	90 ~ 100
3	Trans-Cinnamaldehyde	14371-10-9	액체	132.16	과민성물질 (중간)	양성	40 ~ 100	≤ 20
4	Palmitoyl Chloride	112-67-4	고체	274.87	과민성물질 (중간)	양성	≤ 10	50 ~ 100
5	Imidazolidinyl urea	39236-46-9	액체	388.29	과민성물질 (약한)	양성	10 ~ 45	≤ 10
6	Farnesal	19317-11-4	액체	220.35	과민성물질 (약한)	양성	20 ~ 40	≤ 15
7	Glycerol	56-81-5	액체	92.09	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 7
8	Benzyl alcohol	100-51-6	고체	108.14	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 7
9	Dimethyl isophthalate	1459-93-4	액체	194.19	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 7
10	Propyl paraben	94-13-3	고체	180.20	비과민성물질	음성	≤ 7	≤ 7

부록 2

분석순서의 예

검량선과 표준참조물질 A	STD1 STD2 STD3 STD4 STD5 STD6 Dilution buffer 표준참조물질 A, 반복 1 표준참조물질 A, 반복 2 표준참조물질 A, 반복 3
동시용출대조물질	시험물질 1에 대한 동시용출대조물질 1 시험물질 2에 대한 동시용출대조물질 2
표준참조물질 B	표준참조물질 B, 반복 1 표준참조물질 B, 반복 2 표준참조물질 B, 반복 3
첫 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 1 페닐아세트알데히드(Phenylacetaldehyde), 반복 1 시료1, 반복 1 시료2, 반복 1
두 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 2 페닐아세트알데히드(Phenylacetaldehyde), 반복 2 시료1, 반복 2 시료2, 반복 2
세 번째 반복세트	표준참조물질 C, 반복 3 페닐아세트알데히드(Phenylacetaldehyde), 반복 3 시료1, 반복 3 시료2, 반복 3
표준참조물질 B	표준참조물질 B, 반복 4 표준참조물질 B, 반복 5 표준참조물질 B, 반복 6

- HPLC 분석 시료들은 표를 참고하여 번호 순서대로 분석한다.
- 검량선 및 표준참조물질 A 분석 시작한다 (N = 3)
- 검량선 및 표준참조물질 A 분석 후 분석 된 경우에는 동시용출대조물질은 교대로 분석할 필요는 없다.
- 표준참조물질 B는 시료, 표준참조물질 C 및 양성대조군물질 분석 전 후에 3번(총 6번) 분석한다.
- 표준참조물질 C는 양성대조군 및 시험물질을 분석한다. (각 시료의 첫 번째 반복세트를 분석 후, 두 번째 반복세트를 진행한다)

제37항 생체 외 피부과민성시험(ARE-Nrf2 루시퍼라제시험)

가. KeratinoSens™ 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 루시퍼라제 리포터 유전자를 함유한 인체각질세포주인 KeratinoSens™에서 Nrf2의존성 유전자인 항산화제 반응배열(ARE) 프로모터의 전사 조절을 받는 루시퍼라제 유전자 발현을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성 물질을 구분하는 데 있다.

2. 용어 정의

2.1. 피부과민성(Skin sensitization)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2. 항산화제 반응배열(ARE, Antioxidant response element)

여러 세포보호 유전자 및 제2상 대사효소 유전자의 상위 프로모터 지역에서 발견되는 유전자 배열로서 일반적으로 Nrf2에 의해 활성화되면, ARE는 이들 항산화 유전자의 전사유도에 관여

2.3. Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2)

항산화 반응경로에 관여하는 전사인자. Nrf2가 유비퀴틴화 되어있지 않는 경우, 세포질에 축적되고 핵 내로 이행하여 핵에서 여러 세포보호 유전자의 상위 프로모터 영역에 존재하는 ARE에 결합해 전사를 개시

2.4. 효소활성유도최대농도(I_{max})

음성대조군과 비교하여 시험물질 투여군에서 루시퍼라제의 활성을 최대로 유도한 배율

2.5. IC₃₀

세포생존율을 30 % 감소시키는 시험물질의 농도

2.6. IC₅₀

세포생존율을 50 % 감소시키는 시험물질의 농도

2.7. EC_{1.5}

루시퍼라제의 활성을 1.5 배 증가시키는 시험물질의 농도

II. 시험

1. 원리

이 시험법의 기본원리는 피부과민반응 과정 중 화학물질에 노출된 각질세포에서 ARE 의존적인 세포 내 경로가 활성화되고 유전자 발현이 유도된다는 것이다. 이 시험법은 선별적 플라스미드를 안정적으로 도입한 KeratinoSens™ 에서 Nrf2의존성 유전자인 ARE 프로모터의 전사조절을 받는 루시퍼라제 유전자 발현을 측정함으로써 과민성물질과 비과민성물질을 판정한다. 과민성물질은 ARE를 활성화시켜 루시퍼라제 유전자의 발현을 상승시키며, 이때 루시퍼라제 발광기질을 사용하여 루시퍼라제 효소활성을 정량적으로 측정한다. 이 시험법 단독으로 과민성등급결정 및 안전성평가에 활용하는 것은 완전하지 않으며, 다른 시험법과 함께 보조적으로 통합평가(IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment)방법을 적용할 필요가 있다.

2. 시험의 준비

2.1. 세포주

2.1.1. 종류

ARE의 조절을 받는 루시퍼라제 유전자가 삽입된 세포주를 사용한다. OECD시험법에서는 그 적정성이 검증된 모델로서 상업적으로 구매가 가능한 KeratinoSens™ 를 주로 사용한다. 이는 인체각질세포로부터 유래된 세포주이며 Nrf2의존성 유전

자인 항산화제 반응배열(ARE) 프로모터의 전사조절을 받는 루시퍼라제 유전자를 함유하고 있다.

2.1.2. 일반조건

세포주를 입수하는 즉시 증식시켜(2 계대 ~ 4 계대) 동결보관한다. 동결보관 세포주에 대해서는 최대 25 계대까지 증식시켜 사용할 수 있다. 세포는 적절한 배양액을 사용하여 배양용기 바닥의 80 % ~ 90 %를 차지할 정도로 세포밀도로 증식시킨 후 시험에 사용하는데, KeratinoSensTM의 경우에는 시험 전날에 96-웰 플레이트에 웰 당 10,000 개 세포를 배양한다. 매 시험마다 루시퍼라제 활성은 3 번 반복하여 측정하고 세포생존율은 한 번 측정한다.

2.2. 시험물질

시험물질은 시험 당일 순도 99% 이상의 디메틸설폭사이드(DMSO, DiMethylSulfOxide, CAS 번호 67-68-5)에 용해시키며 멸균여과는 별도로 하지 않아도 된다. DMSO에 녹지 않은 시험물질은 멸균수 또는 배양배지에 녹이되 이 용액은 여과하여 멸균한다. 시험물질은 200 mM 농도로 조제한 후 단계 희석하여 12 개 하위농도를 조제한(0.098 mM ~ 200 mM). 분자량이 정의되지 않은 시험물질은 40 mg/mL 또는 4 %(w/v)로 조제하여 하위농도를 제조한다. 분자량이 정의되지 않은 시험물질은 DMSO 또는 적합한 용매를 사용하여 0.196 µg/mL ~ 400 µg/mL 농도로 조제한 후 희석하여 12 개의 하위농도를 제조한다.

2.3. 용매대조물질(음성대조물질)

DMSO 또는 시험물질을 용해시킨 용매를 사용하며, 플레이트 당 6 개의 웰을 처리한다. 용매대조물질인 DMSO의 최종농도는 1 %로 한다. 이는 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도로서, 시험물질과 양성대조물질에서 사용한 DMSO와 같이 사용한다. 이 시험에서 용매대조군은 음성대조군으로 본다.

2.4 양성대조물질

순도 98 % 이상의 신나믹알데히드(Cinnamicaldehyde, CAS 번호 14371-10-9)를 6.4 mM의 농도로 조제한 후, DMSO로 5 개의 농도로 단계희석하여 최종농도가 4 μ M ~ 64 μ M 범위에 들도록 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험구성

시험물질과 양성대조물질의 양성/음성을 예측하는 데 최소 2 번의 독립적인 반복 시험이 필요하여 각 반복시험은 3 개의 같은 웰(3 반복)로 구성되어야 한다. 2 번의 시험이 일치하지 않으면 3 번째 반복시험을 한다. 각 반복시험은 새로 조제한 시험물질 용액을 사용하고 서로 다른 날짜에 얻은 세포를 사용한다. 같은 계대수의 세포를 사용하는 것은 허용된다.

3.2. 시험물질 노출

세포를 96-웰 플레이트에서 24 시간 동안 배양한다. 그 후 배지를 제거하고, 신선한 배양배지 150 μ L와 25 배 희석된 시험물질과 대조물질이 첨가된 50 μ L의 배양배지를 가해 갈아준다. 플레이트 당 적어도 하나의 웰은 Blank 값을 평가하기 위해 아무것도 넣지 않는다. 시험물질 및 대조물질이 처리된 플레이트를 5 % CO₂, 37 °C \pm 1 °C의 배양기에서 약 48 시간 동안 배양한다. 시험물질이 각 웰 간에 교차 오염되지 않도록 하며 휘발성시험물질의 증발을 막기 위해 배양 전에 플레이트를 잘 덮어야 한다.

3.3. 루시페라제 활성측정

시험물질 및 대조물질을 48 시간 노출시킨 이후 인산완충생리식염수용액으로 세포를 세척하고 세포용해용 완충액을 첨가한 후 실온에서 20 분간 방치한다. 발광측정기에 넣고 판독프로그램을 가동시킨 후 각각의 웰에 루시페라제 기질을 첨가한다. 발광측정기 프로그램에 따라 발광 정도를 측정하여 루시페라제 활성을 평가한다.

3.4. 세포독성평가

시험물질 노출 48 시간 후 시험물질이 함유된 배지를 제거하고, 5 mg/mL 티아졸 일 블루 테트라졸륨 브로마이드(MTT, Thiazolyl blue tetrazolium bromide, CAS 번호 298-93-1)를 함유하는 새로운 배지로 교체한다. 5 % CO₂, 37 °C ± 1 °C에서 4 시간 동안 더 배양시킨다. 그 후 MTT배지를 제거하고 10 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate)용액을 첨가하여 하룻밤 방치한다. 용해된 세포를 잘 흔들어 준 후 600 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. 결과 값 계산(부록 1 참조)

- 루시퍼라제 활성의 최대유도배율의 평균 값(I_{max})
- 루시퍼라제 활성이 1.5 배를 초과 증가하는 시험물질의 농도($EC_{1.5}$)
- 세포생존율을 각각 50 %, 30 %로 감소시키는 시험물질의 농도(IC_{50} 및 IC_{30})

1.2. 결과의 해석 및 예측모델

2 번의 반복시험에서 2 번 모두 또는 3 번의 반복시험 중 2 번이 아래 조건을 모두 만족한다면 그 결과는 양성으로 판정한다.

- (1) I_{max} 는 1.5 배 이상 높으며 음성대조군과 통계적으로 유의한 차이가 있다.
- (2) 루시퍼라제 활성의 유도배율이 1.5 이상인 최저농도($EC_{1.5}$)에 있어서 세포생존율은 70 %보다 높다.
- (3) $EC_{1.5}$ 값이 1000 μ M 미만이다. (분자량 미상 시험물질의 경우, 200 μ g/mL 미만)
- (4) 시험물질에 의한 루시퍼라제 활성유도가 증가하며 용량-반응 상관성을 보인다.

2. 시험의 성립조건

2.1. 수행한 시험은 다음 기준이 충족되어야 한다.

- (1) 양성대조물질의 루시퍼라제 활성유도가 처리한 농도(4 μ M ~ 64 μ M) 중 적어도 하나에서 1.5 배보다 높은 값을 보이며 통계적으로 유의하여야 한다.

- (2) 양성대조물질의 EC_{1.5} 값은 시험기관이 과거로부터 수행해온 자료 평균 값 기준으로 표준편차의 2 배 이내에 들어야 한다. 또한, 64 μ M 농도의 신나믹알데히드에 대한 3 반복 결과의 평균 유도비율은 2 ~ 8 사이여야 한다.
- (3) 양성대조물질의 농도증가에 따라 루시페라제 활성유도가 증가한다는 것을 확인할 수 있는 명확한 용량-반응곡선이 확인되어야 한다.
- (4) 음성대조군(DMSO)에 대한 발광측정 값의 편차는 평균적으로 20 % 미만이어야 한다. 편차가 이보다 클 경우 그 결과는 사용할 수 없다.

2.2. 시험의 정도 관리

부록 2과 부록 3에 따라 시험의 정도 관리를 한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1. 시험물질

3.1.1. 단일조성물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보, 배치/로트 번호 및 사용기한
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, DMSO 용해성, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)
- (3) 시험물질 처리 배지에서의 용해도 또는 분산 안정성에 대한 설명
- (4) 순도, 불순물의 확인(적절하고 거의 실현 가능한 범위에서)
- (5) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (6) 시험농도
- (7) 이용 가능한 범위에서 보관조건과 안정성

3.1.2. 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials)와 혼합물질

- (1) 물질의 특성 정보, 식별정보, 순도, 함유량, 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)

- (2) 물리적인 성상, 수용해도, DMSO 용해성 그리고 추가적인 관련 있는 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- (3) 분자량, 그 구성성분이 알려진 혼합물질/폴리머의 경우 외관분자량, 또는 시험수행과 관련된 다른 정보
- (4) 시험물질 처리 배지에서의 용해도 또는 안정성에 대한 설명
- (5) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (6) 시험농도
- (7) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

3.2. 대조물질

3.2.1. 양성대조물질

- (1) 물질정보: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식 등
- (2) 물리적 성상, 수용해도, DMSO 용해성, 분자량, 추가적인 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 동정(가능한 범위 내에서)
- (4) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)
- (7) 시험가동 승인조건에 적절하였음을 증명하는 과거양성대조물질의 시험결과에 대한 참고문헌

3.2.2. 용매/보조제/음성물질

- (1) 물질정보: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식 등
- (2) 순도, 불순물의 화학적 동정(가능한 범위 내에서)
- (3) 물리적인 성상, 분자량, 추가적인 물리·화학적 성질(시험방법에 언급된 것 이외의 다른 용매/보조제/음성물질을 사용하였을 경우)
- (4) 이용 가능한 범위에서 보관조건과 안정성
- (5) 각 시험물질에 대한 용매/보조제 선택의 타당성

3.3. 시험방법 조건

- (1) 시험의뢰자의 성명, 주소, 시험기관, 시험책임자
- (2) 시험법에 대한 설명(서술)
- (3) 세포주, 보관조건과 출처
- (4) 배양계대수, 부착하여 단일층으로 형성된 배양세포의 밀도(바닥면적에 대한 %로 표현)
- (5) 세포분주에 사용된 세포계수방법, 각 웰에 세포가 동일 숫자로 일정하게 분주되었는지를 확인하기 위한 방법
- (6) 발광측정기 정보, 사용된 기구, 루시페라제 기질, 발광측정의 적정성 자료 (부록 3 참조)
- (7) 시험을 수행함에 있어서 실험실의 숙련도를 증명하기 위해 사용되는 절차, 시험을 재현성 있게 수행할 수 있음을 증명할 수 있는 절차

3.4. 시험절차

- (1) 반복시험의 수, 반복의 수
- (2) 시험물질농도, 시험물질노출 절차, 노출시간
- (3) 평가와 결정의 기준에 대한 사항
- (4) 시험의 성립조건에 대한 사항
- (5) 시험절차의 모든 변경사항

3.5. 결과

- (1) 각 반복시험에 대한 시험물질 및 양성대조물질로부터 얻는 I_{max} , $EC_{1.5}$ 및 세포 독성 값(IC_{30} 혹은 IC_{50}), 모든 개별 반복시험 값으로부터 얻은 평균(I_{max} : 평균, $EC_{1.5}$ 및 생존율: 기하평균) 편차 값, 예측모델에 따라 얻어진 시험물질의 등급에 대한 표시 등을 표로 정리
- (2) 각 실험에 대한 용매/보조제/음성물질의 발광측정 값으로부터 얻은 변동계수
- (3) 루시페라제 활성유도와 생존율에 대한 용량-반응곡선
- (4) 다른 관련된 관찰사항(적용 가능하다면)

3.6. 결과 토의

- (1) KeratinoSens™ 시험법에서 얻어진 결과에 대한 토의
- (2) 통합 평가의 내용 안에서 시험법결과의 고려사항(만약 다른 관련 정보가 이용 가능한 경우)

3.7. 결론

부록 1

루시퍼라제 활성 산출식

1. 루시퍼라제 활성유도배율은 다음 방정식 1에 의해 산출한다. 전체 유도배율은 각 반복시험 결과의 평균 값으로 산출한다.

$$\text{Equation 1: } \text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

L_{sample} 는 시험물질을 처리한 웰에서 발광측정 값

L_{blank} 는 세포가 존재하지 않고, 물질을 처리하지 않은 웰에서의 발광측정 값

L_{solvent} 는 용매(음성대조물질)를 처리한 웰에서 평균 발광측정 값

루시퍼라제 활성의 최대유도배율(I_{max})은 시험물질의 농도 중 어느 범위에서든 최대의 활성유도를 나타내는 평균 결과 값으로 산출한다.

2. $EC_{1.5}$ 는 방정식 2에 따라 선형내삽법에 의해 산출한다. 전체 $EC_{1.5}$ 는 각 반복시험결과의 기하평균 값으로 산출한다.

$$\text{Equation 2: } EC_{1.5} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{1.5 - I_a}{I_b - I_a} \right) + C_a$$

C_a 는 1.5 배 이상의 유도를 가진 μM 의 수준에서 가장 낮은 농도

C_b 는 1.5 배 이하의 유도를 가진 μM 의 수준에서 가장 높은 농도

I_a 는 1.5 배 이상의 유도를 가진 가장 낮은 농도에서 측정된 유도 배수(3 반복 평균)

I_b 는 1.5 배 이하의 유도를 가진 가장 높은 농도에서의 배수 유도 배수(3 반복 평균)

3. 세포생존율은 방정식 3에 의해 산출된다.

$$\text{Equation 3: } Viability = \frac{(V_{sample} - V_{blank})}{(V_{solvent} - V_{blank})} \times 100$$

V_{sample} 는 시험화학물질 웰에서의 흡광도 값

V_{blank} 는 세포가 존재하지 않고, 물질처리하지 않는 웰에서의 흡광도 값

$V_{solvent}$ 는 세포에 용매(음성대조물질)만을 처리한 웰에서의 흡광도 값

4. IC_{50} 과 IC_{30} 은 방정식 4에 따라 선형내삽법에 의해 산출한다. 전체 IC_{50} 와 IC_{30} 은 각 반복시험 결과의 기하평균 값으로 산출한다.

$$\text{Equation 4: } IC_x = (C_b - C_a) \times \left(\frac{(100-x) - V_a}{V_b - V_a} \right) + C_a$$

X: 산출된 농도에서 감소율 %

C_a : 세포생존율의 감소율이 X % 보다 큰 농도 중에서 가장 낮은 농도(μM)

C_b : 세포생존율의 감소율이 X % 보다 작은 농도 중에서 가장 높은 농도(μM)

V_a : 세포생존율의 감소율이 X % 보다 큰 농도 중에서 가장 낮은 농도에서의 생존율 %

V_b : 세포생존율의 감소율이 X % 보다 작은 농도 중에서 가장 높은 농도에서의 생존율 %

부록 2

ARE-Nrf2 Luciferase KeratinoSens™시험법의 숙련도 확인을 위한 물질

본 시험법을 일상적으로 사용하고자 하는 실험실은 사전에 표 1에 제시된 10 종의 물질에 대해 KeratinoSens™에서 제시하는 결과와 정확하게 일치하는 시험결과를 도출해 내는 정도의 숙련도를 보일 수 있어야 한다. 10 종의 숙련도평가물질 중 적어도 8 종에 대하여 KeratinoSens™에서 제시하는 결과와 일치하는 EC_{1.5}와 IC₅₀ 값을 얻어야 한다.

표 1. KeratinoSens™시험법의 숙련도를 증명하기 위한 권고물질

숙련도물질	CAS 번호	물리적 상태	LLNA 예측 (1)	인체 등급 (2)	KeratinoSe ns™ 예측 (3)	EC _{1.5} (μM) 참조 범위 (4)	IC ₅₀ (μM) 참조 범위 (5)
Salicylic acid	69-72-7	고체	비과민성물질	Cat. 6	음성	> 1000	> 1000
Lactic acid	50-21-5	액체	비과민성물질	Cat. 6	음성	> 1000	> 1000
Glycerol	56-81-5	액체	비과민성물질	Cat. 6	음성	> 1000	> 1000
Isopropanol	67-63-0	액체	비과민성물질	Cat. 5	음성	> 1000	> 1000
Ethylene glycol dimethacrylate	97-90-5	액체	과민성물질 (약한)	Cat. 4	양성	5 ~ 125	> 500
Cinnamyl alcohol	104-54-1	고체	과민성물질 (약한)	Cat. 3	양성	25 ~ 175	> 1000
2-Mercaptobenzothiazole	149-30-4	고체	과민성물질 (중간)	Cat. 3	양성	25 ~ 250	> 500
4-Methylaminophenol sulfate	55-55-0	고체	과민성물질 (강한)	Cat. 3	양성	< 12.5	20 ~ 200
Methyldibromoglutaronitrile	35691-65-7	고체	과민성물질 (강한)	Cat. 2	양성	< 20	20 ~ 100
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	과민성물질 (극심한)	Cat. 1	양성	< 12.5	5 ~ 20

부록 3

KeratiSense™ 분석에서 최적의 발광측정을 위한 정도관리

다음은 발광측정기로 측정할 때 신뢰도를 보증받기 위해 필요한 주요 요소들이다.

- 충분한 민감도를 가질 것(배경발광도의 안정성 확보)
- 판독시간이 적정하여 플레이트 간에 차이가 발생하지 않을 것
- 웰 간에 빛의 영향을 주고받지 않을 것

발광측정 정도 관리를 위하여 다음과 같이 모의실험을 할 수 있다.

표 1. 첫 번째 훈련 실험의 플레이트 setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
B	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
C	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
D	EGDMA 0.98	EGDMA 1.95	EGDMA 3.9	EGDMA 7.8	EGDMA 15.6	EGDMA 31.25	EGDMA 62.5	EGDMA 125	EGDMA 250	EGDMA 500	EGDMA 1000	EGDMA 2000
E	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	CA 4	CA 8	CA 16	CA 32	CA 64	Blank

참고 : EGDMA = 강력한 유도 화합물인 Ethylene Glycol DiMethAcrylate (CAS 번호 : 97-90-5)

C = Cinnamic aldehyde, 양성 기준 (CAS 번호 : 104-55-2). 농도는 μ M로 표시 됨

- 행 D에서는 분명한 용량-의존적 반응이 확인되어야 하며, I_{\max} 와 배경발광도의 비율이 20 배 이상 나타나야 함
- 행 H7 ~ H11에서 루시퍼라제 유도의 용량 의존적 증가, 행 H11에서 2 ~ 8 유도배율
- 특히 행 D에서의 발광이 강하므로, 발광오염으로 인해 행 C와 E에서 행 D의 영향에 의한 발광이 나타나지 않아야 함
- 행 A, B, C, E, F 그리고 G 사이에 통계적으로 유의한 차이가 없어야 함
- 행 A, B, C, E, F, G 그리고 H 중 DMSO를 처리한 웰의 발광도 편차는 20 % 이하여야 함

나. LuSens 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험의 목적은 루시페라제 리포터 유전자를 함유한 인체각질세포주 LuSens에서 Nrf2의존성 유전자인 항산화제 반응배열(ARE) 프로모터의 전사조절을 받는 루시페라제 유전자 발현을 측정함으로써 피부과민성물질과 비과민성물질을 구분하는데 있다.

2. 용어 정의

2.1. 피부과민성(Skin sensitization)

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2. 항산화제 반응배열(ARE, Antioxidant Response Element)

여러 세포보호 유전자 및 제2상 대사효소 유전자의 상위 프로모터 지역에서 발견되는 유전자 배열로서 일반적으로 Nrf2에 의해 활성화되면, ARE는 이들 항산화 유전자의 전사유도에 관여

2.3. Nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2)

항산화 반응경로에 관여하는 전사인자. Nrf2가 유비퀴틴화 되어있지 않는 경우, 세포질에 축적되고 핵 내로 이행하여 핵에서 여러 세포보호 유전자의 상위 프로모터 영역에 존재하는 ARE에 결합해 전사를 개시

2.4. 효소활성유도최대농도(I_{max})

음성대조군과 비교하여 시험물질 투여군에서 루시페라제의 활성을 최대로 유도한 배율

2.5. IC₃₀

세포생존율을 30 % 감소시키는 시험물질의 농도

2.6. IC₅₀

세포생존율을 50 % 감소시키는 시험물질의 농도

2.7. EC_{1.5}

루시퍼라제의 활성을 1.5 배 증가시키는 시험물질의 농도

II. 시험

1. 원리

이 시험법의 기본원리는 피부과민반응 과정 중 화학물질에 노출된 각질세포에서 ARE 의존적인 세포 내 경로가 활성화되고 유전자 발현이 유도된다는 것이다. 이 시험법은 선별적 플라스미드를 안정적으로 도입한 LuSens 세포주에서 Nrf2의존성 유전자인 ARE 프로모터의 전사조절을 받는 루시퍼라제 유전자 발현을 측정함으로써 과민성물질과 비과민성물질을 판정한다. 과민성물질은 ARE를 활성화시켜 루시퍼라제 유전자의 발현을 상승시키며, 이때 루시퍼라제 발광기질을 사용하여 루시퍼라제 효소활성을 정량적으로 측정한다. 이 시험법 단독으로 과민성등급결정 및 안전성평가에 활용하는 것은 완전하지 않으며, 다른 시험법과 함께 보조적으로 통합평가(IATA, Integrated Approaches to Testing and Assessment)방법을 적용할 필요가 있다.

2. 시험의 준비

2.1. 세포주

2.1.1. 종류

ARE의 조절을 받는 루시퍼라제 유전자가 삽입된 세포주를 사용한다. OECD시험법에서는 그 적정성이 검증된 모델로서 상업적으로 구매가 가능한 LuSens를 주로 사용한다.

2.1.2. 일반조건

세포주를 입수하는 즉시 증식시켜(1 계대 ~ 3 계대) 동결보관한다. 동결보관 세포주에 대해서는 최대 20 계대까지 증식시켜 사용할 수 있다. 세포는 적절한 배양액을 사용하여 배양용기 바닥의 80 % ~ 90 %를 차지할 정도로 세포밀도로 증식시킨 후 시험에 사용하는데, LuSens의 경우에는 시험 전날에 96-웰 플레이트에 웰 당 10,000 개 세포를 배양한다. 매 시험마다 루시퍼라제 활성과 세포생존율을 3 번 반복하여 측정한다.

2.2. 시험물질

시험물질은 시험 당일에 조제하거나 안정된 동결 용액의 경우에는 해동시킨 다음 순도 99% 이상의 디메틸설폭사이드(DMSO, DiMethylSulfOxide, CAS 번호 67-68-5)에 용해시키며 멸균여과는 별도로 하지 않아도 된다. DMSO에 녹지 않은 시험물질은 멸균수 또는 배양배지에 녹이되 이 용액은 여과하여 멸균한다. 시험물질은 200 mM 농도로 조제한 후 단계 희석하여 12 개 하위농도를 조제한다(0.098 mM ~ 200 mM). 분자량이 정의되지 않은 시험물질은 200 mg/mL 또는 20 %(w/v)로 조제하여 하위농도를 제조한다.

2.3. 용매대조물질

DMSO 또는 시험물질을 용해시킨 용매를 사용하며, 플레이트 당 6 개의 웰을 처리한다. 용매대조물질인 DMSO의 최종농도는 1 %로 한다. 이는 세포생존율에 영향을 미치지 않는 농도로서, 시험물질과 양성대조물질에서 사용한 DMSO와 같이 사용한다.

2.4. 음성대조물질

순도 99% 이상의 DL - 락트산(DL-Lactic acid, CAS 번호 52-21-5)을 5000 μ M (혹은 450 μ g/mL)의 농도로 조제한다. 또한, 세포 배양배지만 들어간 공배지 대조물질을 포함시켜야 한다.

2.5. 양성대조물질

순도 99 % 이상의 에틸렌 글라이콜 디메트아크릴레이트(EGDMA, Ethylene Glycol DiMethyAcrylate, CAS 번호 97-90-5)를 120 μ M의 농도로 조제하여 단계별 희석하여 사용한다. 양성대조물질의 최고 농도인 120 μ M에서 세포독성이 나타나거나 (세포생존율은 70 % 이상이어야 함) 루시퍼라제를 2.5 배 유도하지 못할 경우에는 새로운 농도 범위를 설정하도록 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험구성

시험물질과 양성대조물질의 양성/음성을 예측하는 데 최소 2 번의 독립적인 반복 시험이 필요하여 각 반복시험은 3 개의 같은 웰(3 반복)로 구성되어야 한다. 2 번의 시험이 일치하지 않으면 3 번째 반복시험을 한다. 각 반복시험은 새로 조제한 시험물질 용액을 사용하고 서로 다른 날짜에 얻은 세포를 사용한다. 같은 계대수의 세포를 사용하는 것은 허용된다.

3.2. 시험물질 노출

세포를 96-웰 플레이트에서 24 시간 동안 배양한다. 그 후 배지를 제거하고, 신선한 배양배지 150 μ L와 25 배 희석된 시험물질과 대조물질이 첨가된 50 μ L의 배양배지를 가해 갈아준다. 플레이트 당 적어도 하나의 웰은 Blank 값을 평가하기 위해 아무것도 넣지 않는다. 시험물질 및 대조물질이 처리된 플레이트를 5 % CO₂, 37 \pm 1 $^{\circ}$ C의 배양기에서 약 48 시간 동안 배양한다. 시험물질이 각 웰 간에 교차 오염되지 않도록 하며 휘발성시험물질의 증발을 막기 위해 배양 전에 플레이트를 잘 덮어야 한다.

3.3. 루시퍼라제 활성측정

시험물질 및 대조물질을 48 시간 노출시킨 이후 인산완충생리식염수용액으로 세포를 세척하고 세포용해용 완충액을 첨가한 후 암실에서 5 분 ~ 10 분간 방치한다. 발광측정기에 넣고 판독프로그램을 가동시킨 후 각각의 웰에 루시퍼라제 기질을 첨

가한다. 발광측정기 프로그램에 따라 발광 정도를 측정하여 루시페라제 활성을 평가한다.

3.4. 세포독성평가

시험물질 노출 48 시간 후 시험물질이 함유된 배지를 제거하고, 0.5 mg/mL 티아졸 일 블루 테트라졸륨 브로마이드(Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT, CAS No. 298-93-1)를 함유하는 새로운 배지로 교체한다. 5 % CO₂, 37 °C ± 1 °C에서 2 시간 동안 더 배양시킨다. 그 후 MTT배지를 제거하고 10 % (w/v) SDS(Sodium Dodecyl Sulfate)용액 및 DMSO가 들어간 0.4 % (v/v) 아세트산을 첨가하여 5 분 방치한다. 용해된 세포를 잘 흔들어 준 후 570 nm 및 690 nm에서 흡광도를 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. 결과 값 계산(부록 1 참조)

- 시험된 모든 농도의 시험물질, 양성대조물질, 음성대조물질에서 루시페라제 활성의 유도 배율
- 모든 시험물질의 농도 및 대조군에서의 세포생존율(CV, Cellular Viability)
- 세포생존율 75 % 일때의 농도 값(CV75)

1.2. 결과의 해석 및 예측모델

2 번의 반복시험에서 2 번 모두 또는 3 번의 반복시험 중 2 번이 아래 조건을 모두 만족한다면 그 결과는 양성으로 판정한다.

- 루시페라제 활성의 유도배율이 통계적으로 1.5 배 이상일 것
- 이때의 농도범위에서는 세포독성이 나타나지 않아야 하며 세포 생존율은 70 % 이상일 것

2. 시험의 성립조건

2.1. 수행한 시험은 다음 기준이 충족되어야 한다.

- 양성대조물질 (120 μ M EGDMA)의 루시퍼라제 활성유도 배율이 통계적으로 유의미하게 2.5 배 이상이며 용매대조군 비교하여 상대 세포생존율은 70 % 이상이어야 한다.
- 음성대조물질 (5000 μ M DL-Lactic acid)의 루시퍼라제 활성유도배율은 용매대조물질과 비교하여 1.5 보다 낮은 값이어야 한다.
- 용매대조물질(DMSO)에 대한 발광측정 값의 편차는 평균적으로 20 % 미만이어야 한다.
- 시험농도 3 개 이상 농도군에서 용매대조물질군과 비교하여 세포생존율이 70% 이상이어야 한다.
- 결과가 음성으로 간주되기 위해서는 시험물질 농도중 적어도 하나는 세포독성이 나타나는 (세포생존율이 70 % 미만) 농도로 설정하여야 한다. 혹은 시험물질의 최고 농도를 2000 μ M로 설정 하거나 분자량이 정의되지 않은 물질인 경우는 2000 μ g/mL 농도로 하여야 한다.

2.2. 시험의 정도 관리

부록 2과 부록 3에 따라 시험의 정도 관리를 한다.

3. 시험결과의 보고

시험보고는 다음의 항목을 포함한다.

3.1. 시험물질

3.1.1. 단일조성물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보, 배치/로트 번호 및 사용기한
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, DMSO 용해성, 분자량, 추가 관련 물리·화학적 성질(확보 가능한 범위에서)

- (3) 시험물질 노출 배지에서의 용해도 또는 분산 안정성에 대한 설명
- (4) 순도, 불순물의 확인(적절하고 거의 실현 가능한 범위에서)
- (5) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (6) 시험농도
- (7) 이용 가능한 범위에서 보관조건과 안정성

3.1.2. 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질

- (1) 물질의 특성 정보, 식별정보, 순도, 함유량, 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, DMSO 용해성 그리고 추가적인 관련 있는 물리·화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- (3) 분자량, 그 구성성분이 알려진 혼합물질/폴리머의 경우 외관분자량, 또는 시험 수행과 관련된 다른 정보
- (4) 시험물질 노출 배지에서의 용해도 또는 분산 안정성에 대한 설명
- (5) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (6) 시험농도
- (7) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

3.2. 대조물질

3.2.1. 양성대조물질

- (1) 물질정보: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식 등
- (2) 물리적 성상, 수용해도, DMSO 용해성, 분자량, 추가적인 물리·화학적 성질 (가능한 범위 내에서)
- (3) 순도, 불순물의 화학적 동정(가능한 범위 내에서)
- (4) 전처리 여부(예. 가온, 분쇄 등)
- (5) 시험농도
- (6) 보관조건과 안정성(가능한 범위에서)

- (7) 시험가동 승인조건에 적정하였음을 증명하는 과거양성대조물질의 시험결과에 대한 참고문헌

3.2.2. 용매대조물질

- (1) 물질정보: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식 등
- (2) 순도, 불순물의 화학적 동정(가능한 범위 내에서)
- (3) 물리적인 성상, 분자량, 추가적인 물리·화학적 성질(시험방법에 언급된 것 이외의 다른 용매대조물질을 사용하였을 경우)
- (4) 이용 가능한 범위에서 보존조건과 안정성
- (5) 각 시험물질에 대한 용매대조물질선택의 타당성

3.2.3. 음성대조물질

- (1) 물질정보: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식 등
- (2) 순도, 불순물의 화학적 동정(가능한 범위 내에서)
- (3) 물리적인 성상, 분자량, 추가적인 물리·화학적 성질(시험방법에 언급된 것 이외의 다른 음성대조물질 사용하였을 경우)
- (4) 이용 가능한 범위에서 보존조건과 안정성
- (5) 시험법에 언급된 것 이외의 음성대조물질이 사용되는 경우 음성대조물질 선택의 타당성

3.3. 시험방법 조건

- (1) 시험의뢰자의 성명, 주소, 시험기관, 시험책임자
- (2) 시험법에 대한 설명(서술)
- (3) 세포주, 보관조건과 출처
- (4) 배양계대수, 부착하여 단일층으로 형성된 배양세포의 밀도(바닥면적에 대한 %로 표현)
- (5) 세포분주에 사용된 세포계수방법, 각 웰에 세포가 동일 숫자로 일정하게 분주되었는지를 확인하기 위한 방법
- (6) 발광측정기 정보, 사용된 기구, 루시페라제 기질, 발광측정의 적정성 자료 (부록 3 참조)

- (7) 시험을 수행함에 있어서 실험실의 숙련도를 증명하기 위해 사용되는 절차, 시험을 재현성 있게 수행할 수 있음을 증명할 수 있는 절차

3.4. 시험절차

- (1) 반복시험의 수, 반복의 수
- (2) 시험물질농도, 시험물질노출 절차, 노출시간
- (3) 평가와 결정의 기준에 대한 사항
- (4) 시험의 성립조건에 대한 사항
- (5) 시험절차의 모든 변경사항

3.5. 결과

- (1) 각 반복시험에 대한 시험물질 및 양성대조물질로부터 얻는 루시페라제 활성 유도 배율 및 생존율 값 등을 표로 정리
- (2) 각 반복시험으로부터 얻은 세포생존율 및 루시페라제 활성 유도배율의 평균 및 편차 값
- (3) 각 실험에 대한 용매대조물질의 발광측정 값으로부터 얻은 변동계수
- (4) 루시페라제 활성유도와 생존율에 대한 용량-반응곡선
- (5) 다른 관련된 관찰사항(적용 가능하다면)

3.6. 결과 토의

- (1) LuSens 시험법에서 얻어진 결과에 대한 토의
- (2) 통합 평가의 내용 안에서 시험법결과의 고려사항(만약 다른 관련 정보가 이용 가능한 경우)

3.7. 결론

부록 1

루시퍼라제 활성 산출식

1. 루시퍼라제 활성유도배율은 다음 방정식 1에 의해 산출한다. 전체 유도배율은 각 반복시험 결과의 평균 값으로 산출한다.

$$\text{Equation 1: } \text{Fold induction} = \frac{(L_{\text{sample}} - L_{\text{blank}})}{(L_{\text{solvent}} - L_{\text{blank}})}$$

L_{sample} 는 시험물질을 처리한 웰에서 발광측정 값

L_{blank} 는 세포가 존재하지 않고, 물질을 처리하지 않은 웰에서의 발광측정 값

L_{solvent} 는 용매(음성대조물질)를 처리한 웰에서 평균 발광측정 값

루시퍼라제 활성의 최대유도배율(I_{max})은 시험물질의 농도 중 어느 범위에서든 최대의 활성유도를 나타내는 평균 결과 값으로 산출한다.

2. 세포생존율은 방정식 2에 의해 산출된다.

$$\text{Equation 2: } \text{Viability} = \frac{(V_{\text{sample}} - V_{\text{blank}})}{(V_{\text{solvent}} - V_{\text{blank}})} \times 100$$

V_{sample} 는 시험화학물질 웰에서의 흡광도 값

V_{blank} 는 세포가 존재하지 않고, 물질처리하지 않는 웰에서의 흡광도 값

V_{solvent} 는 세포에 용매(음성대조물질)만을 처리한 웰에서의 흡광도 값

3. 세포생존율이 75 %(CV75)로 감소되는 농도는 방정식 3에 따라 선형내삽법에 의해 산출한다. 전체 CV75는 각 반복시험결과의 기하평균 값으로 산출한다.

$$\text{Equation 3: } \text{CV}_{75} = (C_b - C_a) \times \left(\frac{75 - V_b}{V_b - V_a} \right) + C_b$$

C_a : 세포생존율이 75 % 이상인 농도 가운데 최저 농도 (μM)

C_b : 세포생존율이 75 % 이하인 농도 가운데 최고 농도 (μM)

V_a : C_a 로부터 얻어진 생존율 %

V_b : C_b 로부터 얻어진 생존율 %

부록 2

ARE-Nrf2 Luciferase LuSens시험법의 숙련도 확인을 위한 물질

본 시험법을 일상적으로 사용하고자 하는 실험실은 사전에 표 1에 제시된 10 종의 물질에 대해 LuSens에서 제시하는 결과와 정확하게 일치하는 시험결과를 도출해 내는 정도의 숙련도를 보일 수 있어야 한다. 10 종의 숙련도평가물질 중 적어도 8 종에 대하여 LuSens에서 제시하는 결과와 일치하는 값을 얻어야 한다.

표 1. LuSens시험법의 숙련도를 증명하기 위한 권고물질

숙련도물질	CAS 번호	물리적 상태	LLNA 예측 (1)	인체 등급 (2)	LuSens		
					생체 외 예측 (3)	EC1.5 (μ M) 참조 범위 (4)	CV75 (μ M) 참조 범위 (5)
Salicylic acid	69-72-7	고체	비과민성물질	Cat. 6	음성	> 1000	> 2000
Glycerol	56-81-5	액체	비과민성물질	Cat. 6	음성	> 1000	> 2000
Isopropanol	67-63-0	액체	비과민성물질	Cat. 5	음성	> 1000	> 2000
Sulfanilamide	63-74-1	고체	비과민성물질	음성 (Basketter et al. 1994)	음성	> 1000	> 2000
Eugenol	97-53-0	액체	과민성물질 (약한)	Cat. 3	음성	< 500	< 1000
Cinnamyl alcohol	104-54-1	고체	과민성물질 (약한)	Cat. 3	양성	< 170	> 420
2- Mercaptobenzot hiazole	149-30-4	고체	과민성물질 (중간)	Cat. 3	양성	< 800	< 2000
4-Methylaminop henol sulfate	55-55-0	고체	과민성물질 (강한)	Cat. 3	양성	< 30	< 50
Methyldibromo glutaronitrile	35691-65 -7	고체	과민성물질 (강한)	Cat. 2	양성	< 25	< 50
2,4-Dinitrochlor obenzene	97-00-7	고체	과민성물질 (극심한)	Cat. 1	양성	< 5	< 10

부록 3

LuSens 분석에서 최적의 발광측정을 위한 정도관리

다음은 발광측정기로 측정할 때 신뢰도를 보증받기 위해 필요한 주요 요소들이다.

- EDGMA 농도증가에 따라 루시퍼라제 활성이 용량-의존적으로 증가 (웰 A ~ C의 1 ~ 6)
- 루시퍼라제 활성의 용량-의존적 증가가 관찰되지 않을 것 (웰 D의 1 ~ 6)
- 21개의 용매대조물질 웰(웰 F ~ G의 1 ~ 12)에서 표준편차는 20% 미만이며, “점진적인 변화, gradient-like” 패턴을 보이지 않을 것

발광측정 정도 관리를 위하여 다음과 같이 모의실험을 할 수 있다.

표 1. 첫 번째 모의실험 플레이트 setup

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75/75	EGDMA CV75/1.2						
B	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75/75	EGDMA CV75/1.2						
C	EGDMA CV75/2.07	EGDMA CV75/1.73	EGDMA CV75/1.44	EGDMA CV75/1.2	EGDMA CV75/75	EGDMA CV75/1.2						
D												
E	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium	Medium
F	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
G	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO
H	DL-Lactic acid 5000 M						EGDMA 120 M					Blank

제38항 급성 흡입독성시험(독성등급법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 실험동물에 시험물질을 흡입노출시켜 급성독성 증상을 관찰하는 것을 목적으로 한다. 본 시험은 실험동물의 사용을 최소화하고, 시험물질에 의한 사망이나 고통을 줄이기 위한 동물복지의 관점에서 설계되었다.

2. 용어 정의

2.1 급성 흡입독성

흡입 가능한 물질을 실험동물에 단기간(24 시간 이내)으로 1 회 흡입노출시켰을 때 시험물질에 의해 나타나는 악영향

2.2 반수치사량(LC₅₀)

시험물질에 노출 후 일정 시간 또는 노출 중에 실험동물의 반수를 사망시킬 수 있는 시험물질의 농도. 단위는 공기의 표준부피 당 시험물질의 질량(mg/L) 또는 ppm 으로 표시

II. 시험

1. 원리

본 시험 또는 한계시험에서는 단계마다 암수 각각 3 마리의 실험동물을 사용하며, 암수 중 감수성이 더 민감하다는 과학적 증거가 있어 한쪽 성만을 사용할 경우에는 6 마리를 사용한다. 시작 농도는 4 개의 정해진 농도 중 실험동물에 독성이 나타날 것으로 예상되는 가장 높은 농도로 한다. 시작 농도 노출 후 사망의 정도에 따라 다음 농도를 결정한 후, 단계적으로 노출하고 그 결과를 바탕으로 GHS 분류(Global Harmonization System, 세계분류표시조화) 또는 반수치사량을 예측하게 된다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

2.1.1 동물종의 선택

노출기간 동안에 연령이 8 주령 ~ 12 주령 된 시험용 랫드(다른 설치류도 가능)를 사용하며 개체 간 체중 차이는 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 실험실에서 흔히 사용되는 계통의 건강하고 젊은 성체의 동물을 사용하며 암컷을 사용할 경우, 과거에 새끼를 낳은 적이 없고 현재 임신 중이지 않은 개체를 사용한다. 시험에 사용할 개체는 시험시작 전 최소 5 일 이상 동물실 케이지에서 순화시킨 건강한 동물 중에서 무작위로 선정한다. 각 동물의 식별을 위해 개개의 동물에 표식한다.

2.1.2 사육조건

사육실은 온도가 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, 습도가 $30\% \sim 70\%$ 가 유지되도록 한다. 사육은 암수를 구별하여 농도에 따라 시행하며 각 개체의 상태 관찰이 용이하고 밀도가 높지 않도록 한다. 비부노출 시에는 고정틀에 대한 순화과정이 필요하다. 조명은 인공적으로 12 시간 간격으로 명암을 조절한다. 노출기간을 제외하고는 사료와 음용수를 자유롭게 먹을 수 있도록 공급한다.

2.2. 흡입챔버

시험물질의 물리·화학적 성상과 시험의 목적을 반영하여 흡입챔버를 선택한다. 비부노출은 일반적으로 액체 또는 고체 에어로졸 노출에 좋다. 전신노출방식을 사용할 경우에는 더욱 다양한 목적의 세밀한 정보를 얻을 수 있다. 그러나 전신노출을 시행할 경우에는 그에 대한 정당성이 기술되어야 한다. 실험동물의 총 부피는 챔버 부피의 5% 를 초과하지 않도록 한다.

2.3 노출조건

2.3.1 노출농도

노출시간은 4 시간으로 하며 시험물질은 챔버 내에서 일정한 농도로 유지시킨다. 노출시간을 달리 정한다면 타당한 사유를 제시한다. 전신노출 챔버에서 노출이 시행되는 경우 주변 동물의 털에 묻은 시험물질을 섭취할 수 있으므로 이를 방지하기 위해 동물은 개별 챔버를 사용한다. 시험물질이 폭발할 가능성이 있는 경우에는 폭발농도가 되지 않도록 주의한다.

2.3.2 입자크기의 분포

노출되는 입자를 일정크기로 유지하는 작업이 수행되어야 한다. 호흡기의 전체 각 부분에 노출이 잘 이루어지기 위해 에어로졸입자의 크기는 입자계측기로 평균입경 $1\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m}$ 범위에서 1.5 ~ 3.0의 기하표준편차 값을 나타내는 것이 바람직하다. 금속흡은 이러한 기준치보다 낮을 가능성이 있고 대전입자, 섬유, 흡습성물질(기도의 습환경에서 입경이 증가) 등의 경우에는 기준치보다 높을 가능성이 있다. 또한, 기하학적 표준편차 값의 경우에도 노출되는 입자의 특성에 따라서 기준치를 벗어날 수 있다. 이때는 최종보고서 등에 이러한 결과를 반영하도록 한다.

2.3.3 시험물질의 준비

가능하다면 같은 로트의 시험물질을 사용하여야 한다. 시험물질은 고유의 물리·화학적 특성(순도, 균질성 및 안정성 등)을 유지하는 조건에서 보관하여야 한다. 시험을 시작하기에 앞서 시험물질의 특성 즉, 순도, 불순물의 본질과 불순물의 양 등이 규명되어야 한다. 시험물질(샘플)의 확인이 시험기관의 책임은 아니지만, 적어도 몇 가지 제한된 방법(예를 들어, 색깔, 물리적인 성질)으로라도 시험의뢰자가 제시한 시험물질의 특성을 확인할 수 있어야 한다.

용매(부형제)는 공기 중에서 시험물질의 적절한 농도와 입자크기를 발생시키기 위해 사용되며 일반적으로 물을 사용하는 것이 가장 좋다. 원하는 입자크기의 분포를 얻기 위해 기계적 처리과정을 거치는 경우 시험물질이 분해되거나 변성되지 않아야 한다. 시험물질은 오염되지 않도록 주의하여야 한다. 물 이외의 용매를 사용하였을 때는, 그리고 과거의 흡입독성대조군 자료가 없을 경우에는 용매대조군을 두어야 한다. 용매가 시험농도에서 독성이 없다는 증거가 있다면 용매대조군을 별도로 둘 필요는 없다.

2.3.4 노출조건의 모니터링

(1) 챔버의 공기 흐름

챔버를 통한 공기의 흐름은 주의 깊게 조절하고 지속적으로 모니터링 하며 각 노출기간 동안 적어도 매시간 그 결과를 기록하여야 한다. 산소 농도는 최소한 19 % 이어야 하며 이산화탄소 농도는 1 %를 초과하지 않아야 한다.

(2) 챔버 온도와 상대습도

챔버 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지되어야한다. 이상적으로 상대습도는 30 % ~ 70 %의 범위에서 유지되어야한다. 비부노출이든 전신노출이든 동물들이 호흡하는 위치(영역)에서 상대습도는 4 시간의 노출기간 동안에 최소 3 번 측정 및 기록하여야 한다.

(3) 시험물질 명목농도

명목농도는 챔버에 발생된 시험물질의 총 질량을 챔버를 통과하는 공기의 총 부피로 나누어 얻어지는 값이며, 노출 후에는 농도를 계산하고 기록한다.

(4) 시험물질 분석농도

시험물질의 분석농도는 동물의 호흡구역 내에서 측정되는 농도이다. 노출시간 동안 각 시험의 실제농도 측정방법에 따라서 연속적으로 또는 주기적으로 측정하며 시험물질의 특성에 따라 중량측정법 또는 적절한 분석법을 이용한다. 사망농도 값 계산을 위한 통계분석에는 분석농도 값만을 사용하도록 한다.

주기적 측정의 경우 4 시간 노출기간 동안 적어도 2 번은 공기샘플을 채취한다. 만약 공기의 흐름이 제한적이거나 시험물질의 농도가 낮아 연속측정이 불가능하다면 전체노출기간 동안에 한 번만 샘플링을 하여도 된다. 만약 샘플마다의 측정값이 너무 차이가 난다면 다음번 시험에서 시험물질의 농도는 노출 당 4 번 샘플링을 하여 측정하여야 한다. 개개의 챔버 농도샘플은 평균값을 크게 벗어나지 않아야 하며 가스와 증기에 대해서는 $\pm 10\%$ 이상, 그리고 액체와 고체 에어로졸에 대해서는 $\pm 20\%$ 이상 벗어나지 않아야한다. 전신노출의 경우 챔버에 시험물질의 농도가 평형에 도달하는 시간(t_{95})을 계산하고 기록하여야 하며 비부노출의 경우에는 생략하여도 된다.

(5) 시험물질 입자크기 분포

에어로졸의 경우 노출시간 동안 최소 2 번 이상 다단입경측정장치(Cascade impactor) 또는 대체 장비인 입자계측기(Aerodynamic particle sizer) 등을 이용하여 입자크기 분포를 측정한다. 증기물질의 경우 응결되어 에어로졸화 될 가능성이 있는 데 이 경우도 입자크기 분포를 측정하는 것이 바람직하다.

3. 시험

3.1 한계시험

- (1) 한계시험은 시험물질이 규제농도 이하에서 비독성물질로 알려져 있거나 예상되는 경우에만 수행한다.

- (2) 한계시험은 가스에서는 20,000 ppm, 증기에서는 20 mg/L, 고상 에어로졸/액상 에어로졸에 대해서는 5 mg/L에서 수행한다. 시험 단계마다 암수 각각 3 마리를 사용하며, 암수 중 감수성이 더 민감한 성별 한쪽만을 사용할 경우에는 6 마리를 사용한다.
- (3) 에어로졸에 대한 시험을 할 경우에는 호흡 가능한 입자크기($1\ \mu\text{m} \sim 4\ \mu\text{m}$)를 얻어야 한다. 2 mg/L보다 더 높은 농도의 에어로졸시험은 호흡 가능한 입자크기가 얻어질 수 있을 때만 시험한다.
- (4) GHS 카테고리 5에 대한 시험은 그 결과가 인체건강을 보호할 수 있다는 직접적인 관련성이 있을 때에만 시도하며 그 정당한 사유가 제시되어야 한다.

3.2 본 시험

3.2.1. 각 시험 단계마다 암수 각각 3 마리를 사용하며, 암수 중 감수성이 더 민감한 성별 한쪽만을 사용할 경우에는 6 마리를 사용한다.

3.2.2. 시험시작은 설정된 시험농도 중에서 가장 강한 독성증상이 나타날 것으로 예상되는 농도 하나를 선택하여 암수 각각 3 마리씩 노출하고, 이때 나타난 결과를 통해 다른 단계에서의 시험을 계속 진행한다.

- 가스: 100 ppm/4 h, 500 ppm/4 h, 2500 ppm/4 h, 20000 ppm/4 h (별표 1)
- 증기: 0.5 mg/L/4 h, 2 mg/L/4 h, 10 mg/L/4 h, 20 mg/L/4 h (별표 2)
- 에어로졸: 0.05 mg/L/4 h, 0.5 mg/L/4 h, 1 mg/L/4 h, 5 mg/L/4 h (별표 3)

3.2.3. 노출간격은 독성증상의 시작 시각, 지속시간 및 그 독성의 정도에 따라 정한다. 시험물질 노출 후 동물들의 생존/사망 여부가 확실하게 결정된 후 다음 단계의 노출을 진행한다.

3.2.4. 지연독성을 관찰하기 위해서는 농도별 노출간격을 3 ~ 4 일 간격으로 둔다.

3.2.5. 관찰은 노출 당일에는 적어도 2 번 시행하며, 노출에 대한 동물들의 반응이 나타날 때는 그 이상 시행한다. 이후 14 일까지 적어도 매일 1 회 이상 관찰한다.

3.2.6. 독성증상이 나타나기 시작한 시간과 소멸되기 시작한 시간은 매우 중요하며,

독성반응이 지연되는 경향은 더욱 중요하다. 모든 관찰결과는 체계적으로 개체별로 기록한다.

3.2.7. 관찰은 피부 및 털, 눈 및 점막, 호흡기계, 순환기계, 자율 및 중추신경계, 행동 유형을 포함한다. 특히 진전, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수상태 등의 증상은 유의하여 관찰한다.

3.2.8. 체중은 순화기간, 시험물질 노출 직전과 1, 3, 7 일 후, 사망 후 측정하며, 실험 전과 비교하여 20 % 이상의 지속적인 감소를 보이는 동물은 주의 깊게 관찰한다. 시험 중 사망 및 빈사동물을 포함하여 모든 실험동물은 부검 후 소견을 기록한다. 사망동물은 사후 자가용해가 일어나지 않도록 냉장보관하고 부검은 가능한 즉시 시행한다. 필요 시 부검 후 조직병리학적 관찰을 통한 소견을 기록한다.

3.2.9. 추가적인 검사는 생존 랫드의 폐 중량 그리고/또는 호흡기계의 현미경검사 등을 포함할 수 있다.

3.3 관찰

3.3.1 일반증상

- (1) 각 동물에 대하여 일반적으로 유지관리 되는 기록과 함께, 모든 임상관찰은 체계적으로 잘 기록하여야 한다.
- (2) 케이지 밖에서의 관찰항목으로서는 피부와 털, 눈과 점막 그리고/또한 호흡기, 순환기, 자율신경계와 중추신경계, 그리고 신체활동과 행동 패턴을 포함한다. 가능하다면 모든 국소적 전신적 효과에 대한 차이가 기록되어야 한다. 진전, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 수면, 혼수상태의 관찰에 초점을 맞추어야 한다.

3.3.2 체중

순화기간, 노출 전, 노출 후, 관찰기간, 부검 또는 안락사 시에는 개별동물의 체중을 측정하고 기록하여야 한다. 체중 변화는 독성발현의 주요 인자이므로, 노출 전 측정한 체중 대비 20 % 이상의 체중 감소가 관찰된 동물의 경우 주의 깊게 관찰하여야 한다.

3.3.3 병리검사

동물의 부검 시에는 특히 기도에서 나타나는 변화를 주의 깊게 관찰하여야 한다. 그 외 독성징후가 있는 장기의 경우에는 이들 장기도 조사하는 한편 모든 육안적 병리 변화를 기록하여야 한다. 만약 부검 전에 사망한 동물이 발생되면 냉장상태로(냉동이 아닌) 보관한다. 이때 부검은 사망 개체의 발견 즉시 하는 것이 좋으며, 가능한 하루나 이틀 이내로 바로 수행하여야 한다. 표적기관에 대한 현미경 검사는 다양한 독성학적 정보를 제공하기 때문에 가능한 수행하는 것이 좋다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

체중, 부검결과, 실험동물 수, 독성증상을 보이는 실험동물 수, 시험기간 중 사망동물 수, 인도적 이유로 안락사 시킨 동물의 수, 사망시간, 독성발현 및 회복시간 등을 표로 요약하여 기록한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2. 시험책임자 및 담당자 성명

2.3. 실험동물

종, 케이지 당 동물의 수, 성별, 주령, 공급원, 사육조건, 깔개 류, 광주기, 상대습도, 사료 및 음용수, 실험 전 조건(식이, 검역, 질병 치료 등)

2.4. 시험물질

물질명과 CAS 번호, 로트 번호, 물리적 특성 및 순도, 시험과 관련된 물리·화학적 특성, 시험물질의 안정성, 균질성, 불순물의 본질 및 양, 입자크기의 분포

2.5. 용매(부형제)

선정사유 등

2.6. 흡입챔버 및 이와 관련된 장비, 시스템에 대한 설명

- (1) 크기, 부피를 포함한 흡입챔버에 대한 설명
- (2) 공기 발생 및 실험동물의 노출에 사용된 장비에 대한 설명, 구매처
- (3) 온도, 습도, 입자크기, 그리고 챔버 내 실제농도 등을 측정하는 장비에 관한 사항
- (4) 공기의 공급원, 공급된/추출된 공기 및 챔버 환경조절에 사용된 시스템
- (5) 같은 실험환경을 만들기 위한 장비의 검·교정에 사용된 방법
- (6) 압력차(양압 또는 음압)
- (7) 챔버 당 노출포트(비부노출), 시스템에서 동물들의 위치(전신노출)
- (8) 시험에 사용된 공기의 일시적 동질성 및 안정성
- (9) 온도와 습도장치의 위치와 챔버에서 시험에 사용된 공기의 샘플링
- (10) 공기 유속, 노출포트(비부노출) 별 공기 유속, 또는 챔버 당 동물 투입 수(전신 노출)
- (11) 만약 적용 가능하다면 산소와 이산화탄소를 측정하기 위해 사용되는 장비에 관한 정보
- (12) 흡입챔버의 농도평형에 도달하는데 걸리는 시간
- (13) 시간 당 부피 변화의 수
- (14) 미터링장치(만약 적용 가능하다면)

2.7. 노출조건

목표농도설정 근거, 명목농도, 분석농도, 공기농도, 입자 정보

2.8. 시험조건

시험물질 및 시험환경 준비절차, 분석수단 및 검증방법, 시험농도 선정에 대한 논리적 근거

2.9. 시험결과

- (1) 챔버 온도, 습도, 공기 흐름의 측정결과에 대한 표
- (2) 챔버의 명목농도와 분석농도 자료에 대한 표
- (3) 분석샘플 수집 자료, 입자크기 분포, 공기역학중량평균지름(MMAD; Mass median aerodynamic diameter) 및 편차의 계산을 포함하는 입자크기에 관한 표

- (4) 각각의 동물에 대하여 반응 자료와 농도 수준에 관한 표(예를 들어 사망, 특성, 심각성, 그리고 효과의 지속기간 등 독성증상을 보이는 동물)
- (5) 시험기간 동안 수집된 각 개체의 체중, 만약 예정된 안락사 시간 이전에 사망한다면 사망 날짜와 시간, 독성신호의 시작에 대한 경과, 각각의 동물에 대하여 가역적인 과정이 있었는지
- (6) 각 개체의 동물들에 대한 부검 자료와 조직병리학적 자료(얻을 수 있다면)
- (7) GHS 분류 카테고리 범주 및 LC₅₀ 값

2.10 결과의 해석

사용방법 기술, 입자들의 호흡 가능성, 명목농도 및 분석농도 측정방법 및 평가, 사망원인, 독성작용양식, 안락사에 대한 설명

별표 1

가스상 시험물질(ppm/4 h)의 경우 각 단계의 시작농도를 결정하는 절차

일반적인 언급

아래 그림에 제시된 각각의 시험절차에 대한 시작농도는 아래와 같다.

부록 1a: 시작농도는 100 ppm

부록 1b: 시작농도는 500 ppm

부록 1c: 시작농도는 2500 ppm

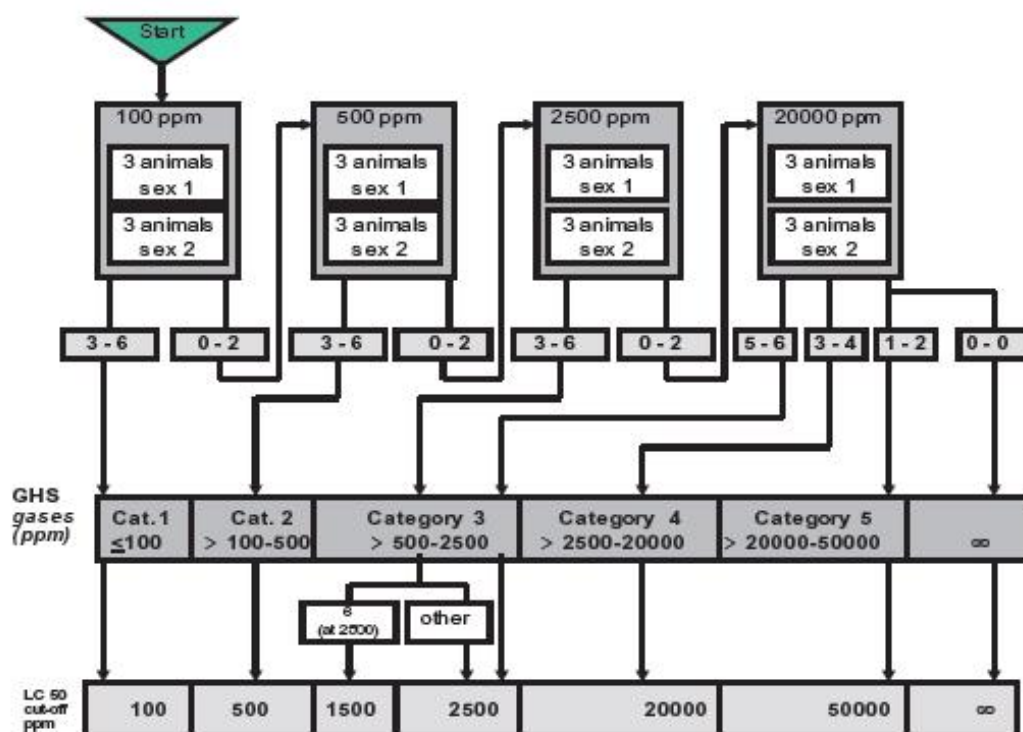
부록 1d: 시작농도는 20000 ppm

인도적으로 안락사 시킨 동물 또는 사망한 동물의 수에 따라 화살표 방향으로 시험을 진행한다.

ANNEX 1a

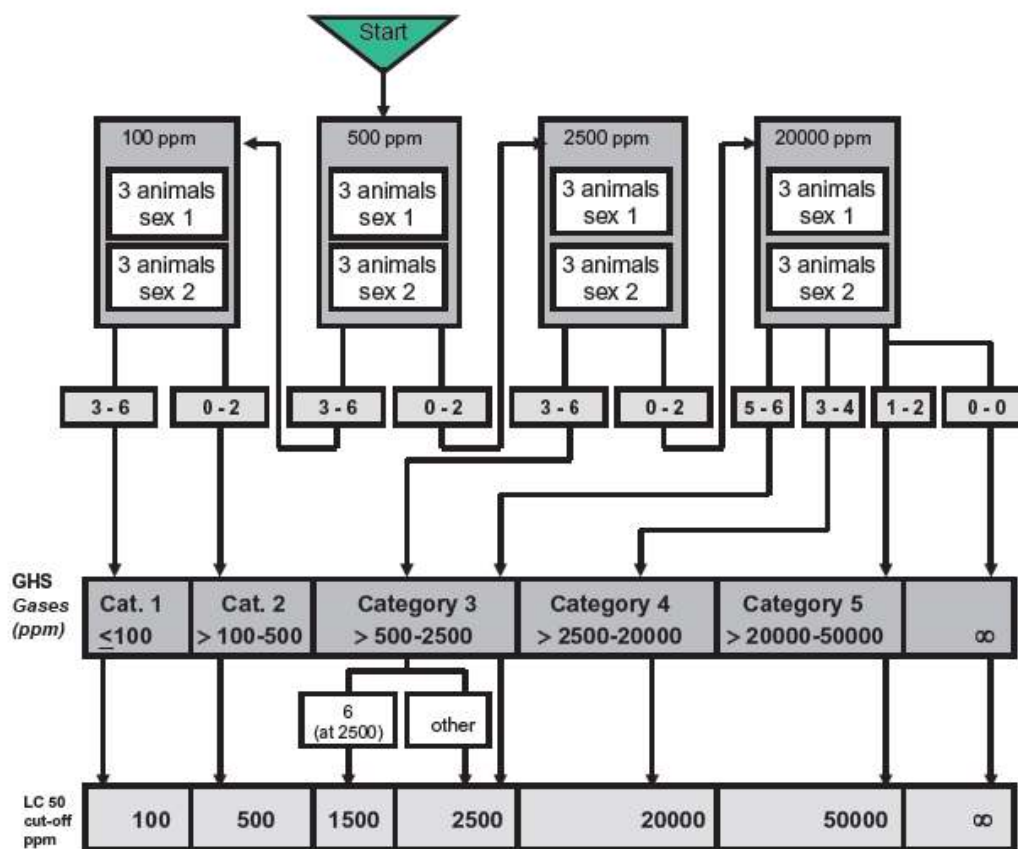
Acute Inhalation Toxicity:

Test Procedure with a starting concentration of 100 ppm/4 h for gases



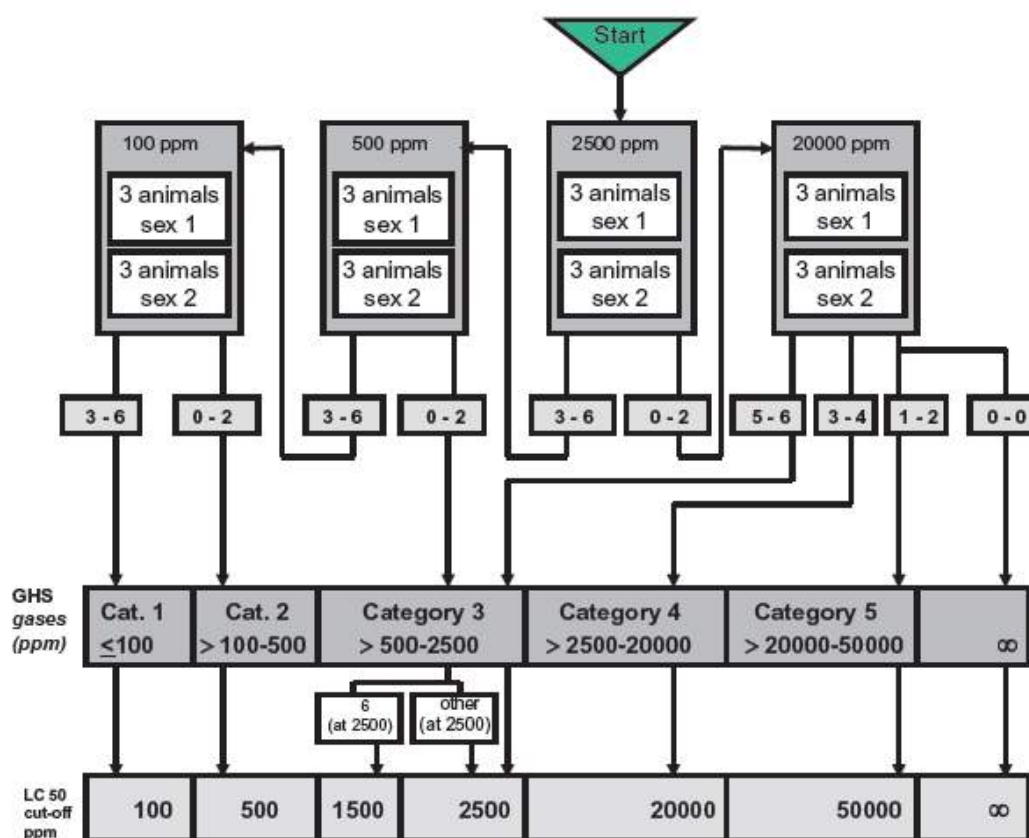
- 3 ● + 3 ☉, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals / tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 1 b
Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 500 ppm/4h for gases



- 3 ● + 3 ☉, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 1 c
Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 2500 ppm/4h for gases



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 1 d
Acute Inhalation Toxicity:
Test Procedure with a starting concentration of 20000 ppm/4h for gases

The flowchart illustrates the test procedure for acute inhalation toxicity of gases. It begins at a starting concentration of 20000 ppm/4h. At each concentration, 3 animals of each sex are tested. The results (mortality) are used to determine the next concentration or the final GHS category and LC50 cut-off.

Test Procedure Flow:

- Start** (20000 ppm/4h): 3 animals sex 1, 3 animals sex 2. Results: 3-6, 1-2, 0-0.
- 2500 ppm**: 3 animals sex 1, 3 animals sex 2. Results: 3-6, 0-2. If 3-6, proceed to 500 ppm. If 0-2, proceed to 100 ppm.
- 500 ppm**: 3 animals sex 1, 3 animals sex 2. Results: 3-6, 0-2. If 3-6, proceed to 100 ppm. If 0-2, proceed to 100 ppm.
- 100 ppm**: 3 animals sex 1, 3 animals sex 2. Results: 3-6, 0-2. If 3-6, proceed to GHS Cat. 1. If 0-2, proceed to GHS Cat. 2.

GHS gases (ppm) and LC 50 cut-off ppm:

GHS gases (ppm)	LC 50 cut-off ppm
Cat. 1 <100	100
Cat. 2 >100-500	500
Category 3 >500-2500	1500
Category 4 >2500-20000	2500
Category 5 >20000-50000	20000
∞	50000
∞	∞

Legend:

- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at ≥ 20000 ppm/4h: se Guidance Document 39 (8)

별표 2

증기상 시험물질(mg/L/4 h)의 경우 각 단계의 시작농도를 결정하는 절차

일반적인 언급

아래 그림에 제시된 각각의 시험절차에 대한 시작농도는 아래와 같다.

부록 2a: 시작농도는 0.5 mg/L

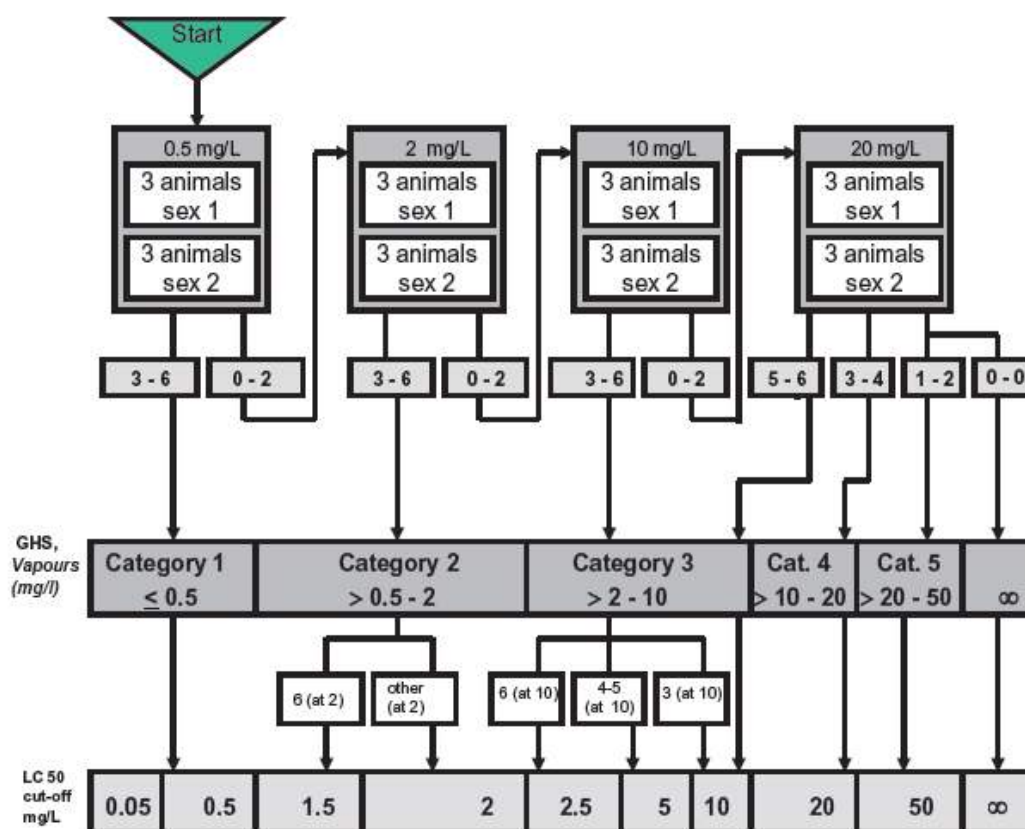
부록 2b: 시작농도는 2.0 mg/L

부록 2c: 시작농도는 10 mg/L

부록 2d: 시작농도는 20 mg/L

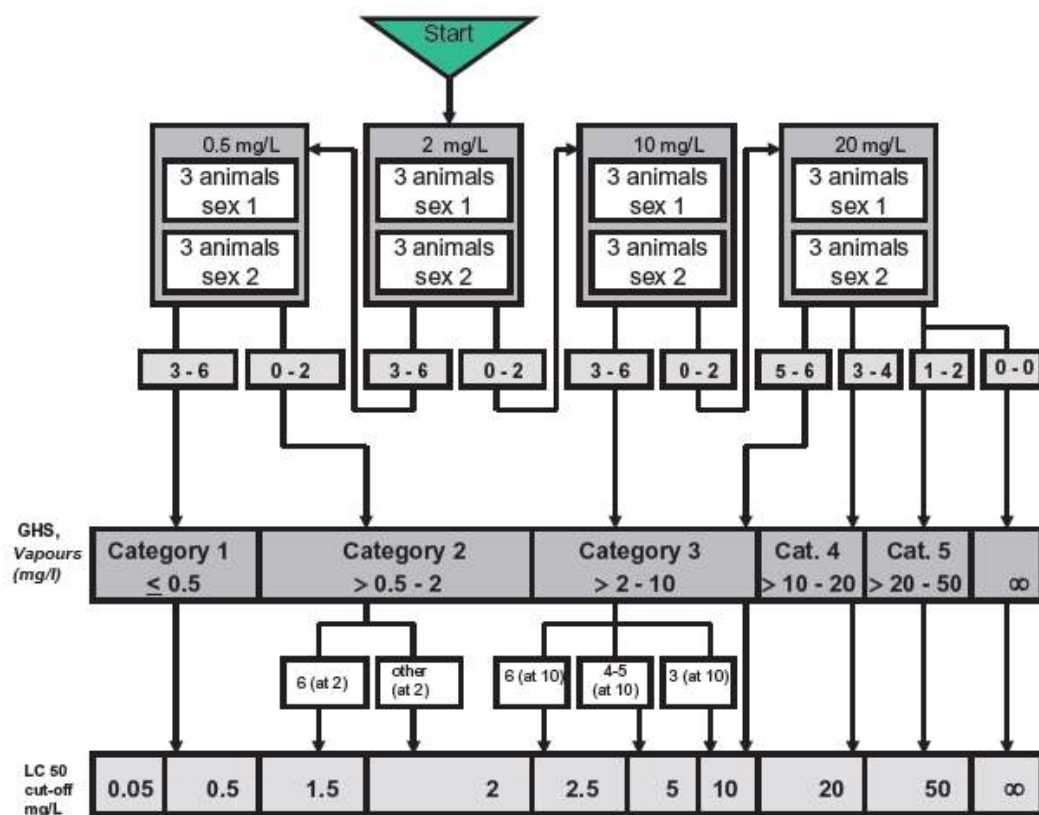
인도적으로 안락사 시킨 동물 또는 사망한 동물의 수에 따라 화살표 방향으로 시험을 진행한다.

ANNEX 2 a
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 0.5 mg/L/4h for vapours



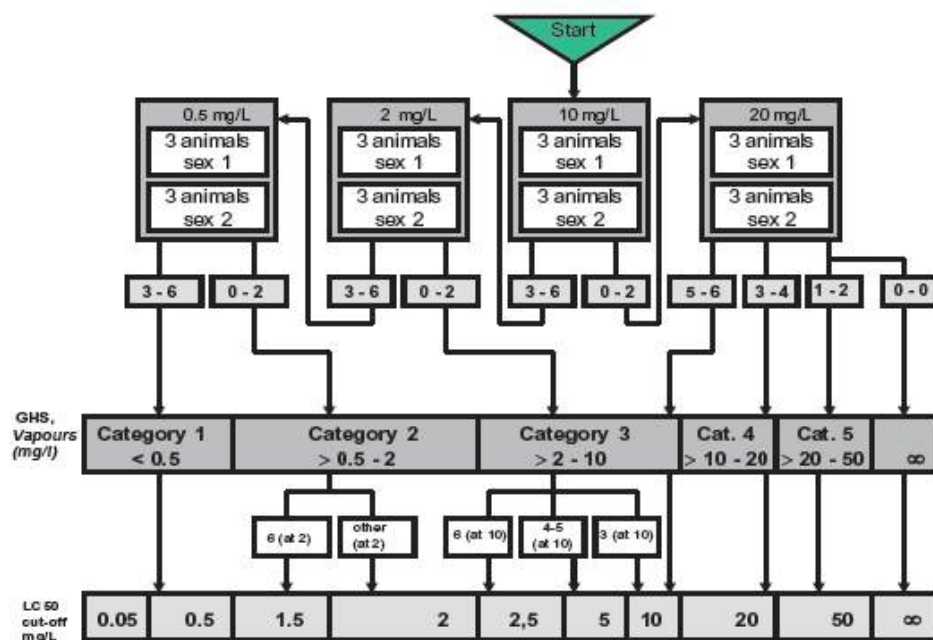
- 3 ● + 3 ☉, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 2 b
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 2 mg/L/4h for vapours



- 3 ● + 3 ☹, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 2 c
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 10 mg/L/4h for vapours



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 2 d
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 20 mg/L/4h for vapours

	Start									
	0.5 mg/L 3 animals sex 1		2 mg/L 3 animals sex 1		10 mg/L 3 animals sex 1		20 mg/L 3 animals sex 1			
	3 animals sex 2		3 animals sex 2		3 animals sex 2		3 animals sex 2			
	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	0 - 2	3 - 6	1 - 2	0 - 0	
							5-6 (at 20)	3-4 (at 20)		
GHS, Vapours (mg/l)	Category 1 ≤ 0.5		Category 2 > 0.5 - 2		Category 3 > 2 - 10		Cat. 4 > 10 - 20		Cat. 5 > 20 - 50	∞
			6 (at 2)	other (at 2)	6 (at 10)	4-5 (at 10)	3 (at 10)			
LC 50 cut-off mg/L	0.05	0.5	1.5	2	2,5	5	10	20	50	∞

- 3 ● + 3 ☹, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 50 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

별표 3

에어로졸상 시험물질(mg/L/4 h)의 경우 각 단계의 시작농도를 결정하는 절차

일반적인 언급

아래 그림에 제시된 각각의 시험절차에 대한 시작농도는 아래와 같다.

부록 3a: 시작농도는 0.05 mg/L

부록 3b: 시작농도는 0.5 mg/L

부록 3c: 시작농도는 1 mg/L

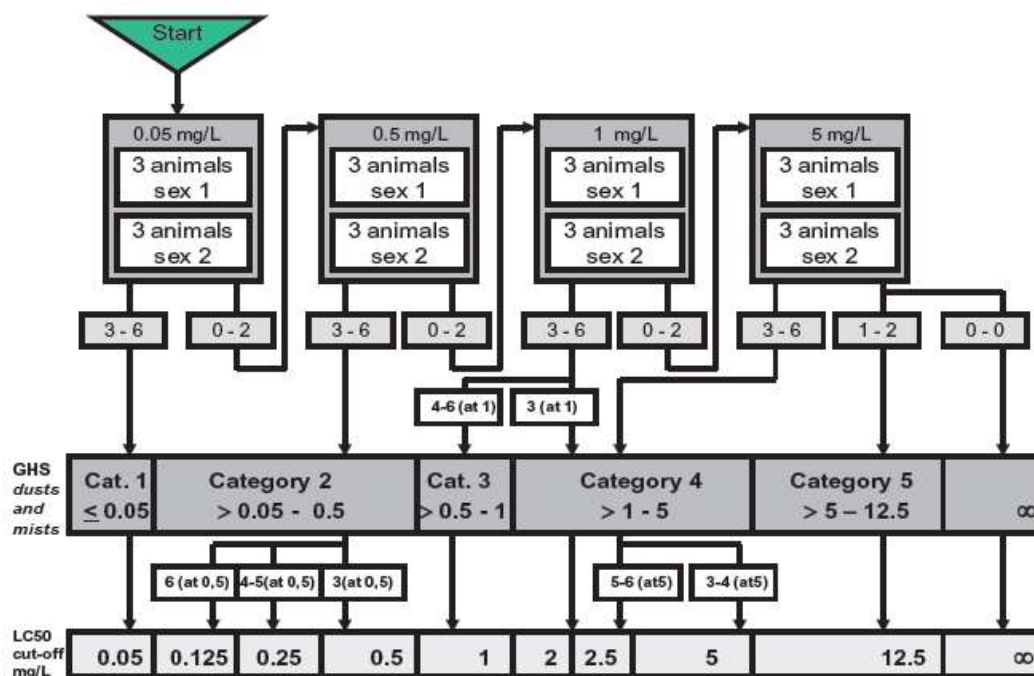
부록 3d: 시작농도는 5 mg/L

인도적으로 안락사 시킨 동물 또는 사망한 동물의 수에 따라 화살표 방향으로 시험을 진행한다.

ANNEX 3 a

Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 0.05 mg/L/4h for aerosols



- 3 ● + 3 ☉, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

Acute Inhalation Toxicity:

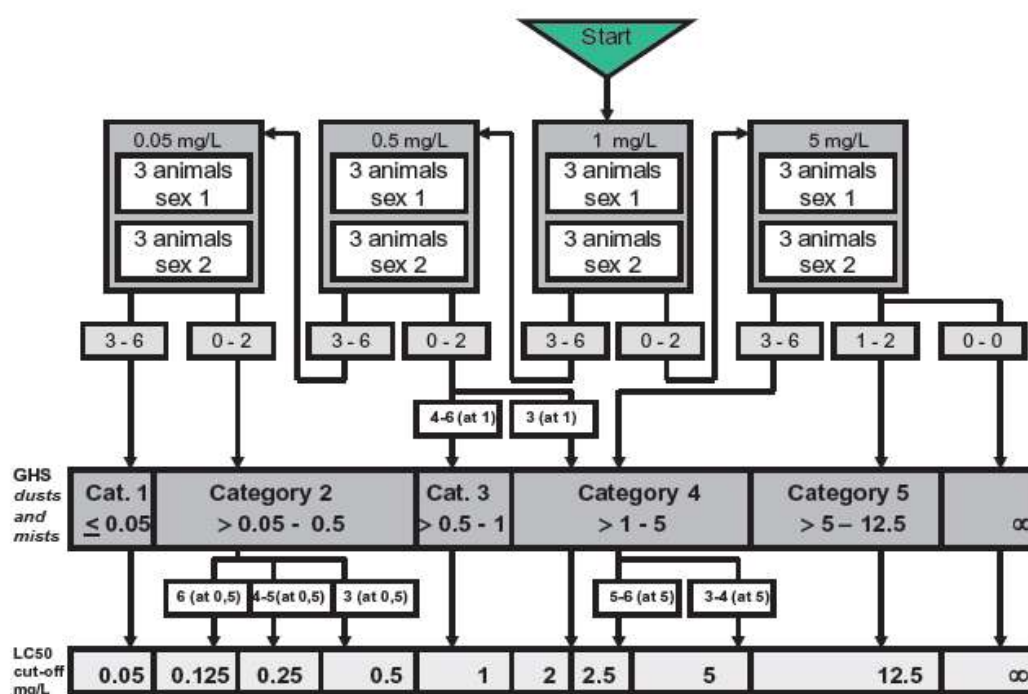
Start

- 3 ● + 3 ☹ or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 3 c

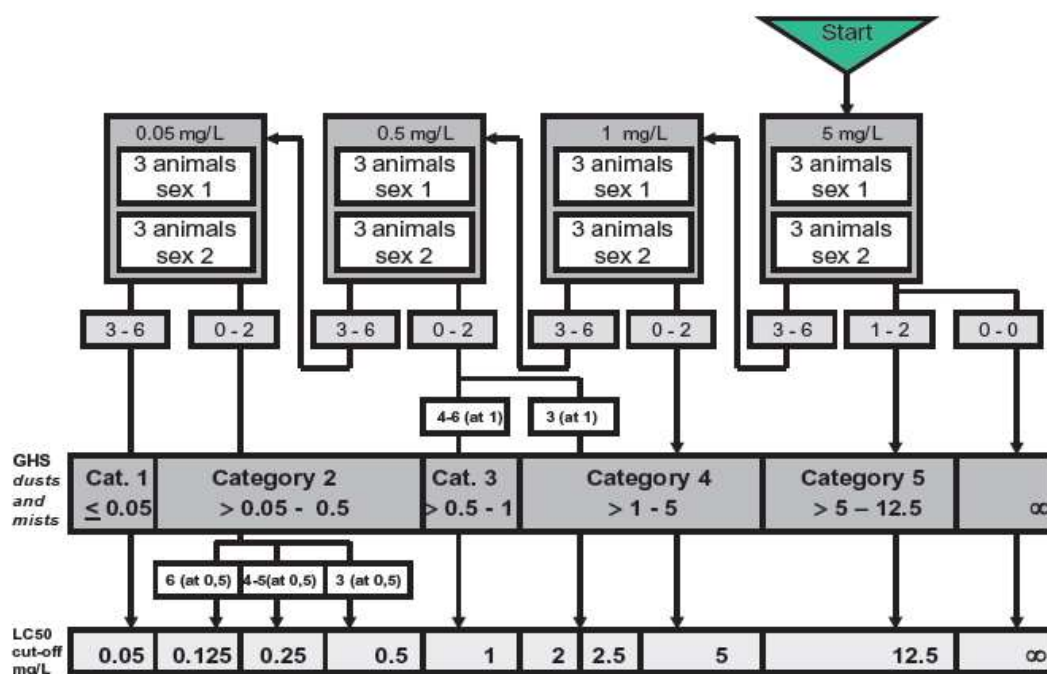
Acute Inhalation Toxicity:

Test procedure with a starting concentration of 1 mg/L/4h for aerosols



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

ANNEX 3 d
Acute Inhalation Toxicity:
Test procedure with a starting concentration of 5 mg/L/4h for aerosols



- 3 ♂ + 3 ♀, or 6 animals of the more susceptible sex are used per step
- 0-6: Number of moribund or dead animals/tested concentration
- GHS: Globally Harmonized Classification System
- ∞: unclassified
- Testing at 12.5 mg/L/4h: see Guidance Document 39 (8)

제39항 유전독성시험(포유류를 이용한 생체 내 알칼리코멧시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질을 투여한 설치류 등의 동물로부터 분리한 세포 또는 핵에 함유된 DNA의 절단 여부를 평가함으로써 시험물질에 의한 DNA 손상을 규명하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 알칼리성 단세포 겔 전기영동법

개별 세포 또는 핵의 수준에서 초기의 DNA 손상을 검출하는 고감도 시험기법

2.2 코멧(Comet)

세포핵에 전기장을 가해 전기영동을 실시한 후 나타나는 모양이며 코멧의 모양과 유사하므로 불리게 되는 명칭: 머리는 핵이고, 꼬리는 전기장에 의해 핵으로부터 이동한 DNA로 구성

2.3 꼬리의 강도 또는 꼬리(tail) DNA 백분율(% tail DNA)

이것은 코멧의 전체 강도(코멧의 머리 + 꼬리(tail))에 대한 꼬리(tail)의 상대적인 강도를 의미하며 절단된 DNA의 양을 백분율로 반영

2.4 유령세포(Hedgehogs, Clouds, Ghost Cells)

코멧 이미지 중 하나. 머리 부분이 작거나 존재하지 않으며, 꼬리(tail)는 매우 퍼져있는 세포

II. 시험

1. 원리

포유류를 이용한 알칼리 코멧시험은 생체 내에서의 유전독성물질의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 따른 독성동태학적 현상을 반영할 수 있고, DNA 수복 과정을 반영할 수 있다는 점에서 시험물질의 유전독성을 평가하는 데 중요하다. 시험의 원리

는 다음과 같다. 우선 적절한 투여경로를 선정하여 동물을 시험물질에 노출한 후, 선택한 시료채취 시간에 원하는 조직을 적출하여 단세포 또는 핵의 부유액을 조제하고, 연한천(soft agar)에 포매하여 슬라이드에 고정한다. 세포 또는 핵을 용해완충액으로 처리하여 세포막 또는 핵막을 제거하고, 강알칼리(예. pH 13 이상)에서 느슨한 DNA 루프와 DNA 절편을 유리시킨다. 한천에 있는 핵 DNA를 전기영동시키면 조각난 DNA와 풀린 DNA 루프는 양극쪽으로 이동한다. 전기영동 후 형광염색법을 사용하여 DNA를 시각화한 후 꼬리 DNA 백분율(% tail DNA 또는 % tail intensity)을 DNA 손상의 지표로 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

(1) 건강하고 젊은 성체의 설치류(6 주령 ~ 10 주령)를 사용한다. 보통 랫드가 사용되며 시험개시 시점에서 실험동물의 체중 차이는 성별 평균 체중의 20 %가 넘지 않도록 한다. 전형적인 코멧시험은 투여군(3 군), 동시양성대조군(군 당 최소 3 마리)과 동시음성대조군으로 구성되며 단일성별로 군 당 5 마리로 설정할 경우 최소 25 마리의 동물이 필요하다. 시험 전 최소 5 일 이상의 순화기간을 두며, 노출대상이 성 특이성을 일으킬 수 있는 물질은 암컷 또는 수컷 가운데 적절한 성을 선택하여 사용한다. 각 동물의 식별을 위해 개개의 동물에 표시한다.

(2) 성별 차이를 식별하기 위해서는 용량마다 암수별로 각각 최소 5 마리가 사용된다.

2.2 사육조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 50 % ~ 60 %가 되도록 유지한다. 사육은 개별적으로 또는 같은 성별의 소그룹 단위로 나누어 실시한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명암주기를 12 시간 간격으로 설정한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

2.3 시험물질의 조제

고체물질은 적절한 용매나 보조제를 사용하여 용해 또는 분산시켜 사용한다. 액체 물질은 직접 사용하거나 적절히 희석하여 사용한다. 조제된 시험물질의 안정성 자료가 확보되지 않은 경우, 시험 직전에 조제한다.

2.4 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성이 없고 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않는 것이라야 한다. 먼저 수용성인 용매 또는 보조제의 사용을 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매 또는 보조제 이외의 것을 사용할 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시하도록 한다.

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성정보가 부족할 경우, 시험농도를 선정하기 위한 용량결정시험을 수행할 수 있다. 시험물질이 용량결정시험 결과 또는 기존 자료에 근거하여 독성을 나타내지 않을 경우, 최고용량(한계량)은 투여기간이 14 일 이상이면 1,000 mg/kg/day, 투여기간이 14 일 미만이면 2,000 mg/kg/day로 한다. 시험물질이 독성을 일으킨다면, 투여되는 최고용량은 최대내성용량(MTD, maximum tolerated dose)으로 하며 용량 수준은 최대용량에서부터 독성을 약간 일으키거나 일으키지 않는 용량까지의 범위를 포함하도록 한다.

3.2 대조군

시험마다 동시에 수행되는 양성(용매 또는 보조제)대조군을 포함하도록 한다. 또한, 과거대조군 데이터를 구축해야 하며, 조직 및 종마다 대조군 범위를 확립해야 한다.

3.2.1 음성대조물질

시험군에서 시험물질을 투여하는 데 용매 또는 보조제를 사용한다면 음성대조군에는 동일한 용매 또는 보조제를 투여한다.

3.2.2 양성대조물질

양성대조물질은 시험물질의 독성이 나타날 것으로 생각되는 관심 조직에서 DNA 가닥의 절단을 유발하는 것이 확인되어야 하며, 알려진 돌연변이물질에 대해서는 저용량노출에 의해서도 매우 약한 돌연변이반응도 측정할 수 있어야 한다. 투여용량은 중증도의 영향을 일으킬 수 있는 정도의 용량으로 하며, 실험실이 설정한 용량-반응곡선에 따라 선택한다. 양성대조물질의 예는 표 1에 나타나 있다.

표 1. 양성대조물질의 예와 그 표적 조직의 일부

물질명과 CAS 번호
Ethylmethanesulfonate(CAS 번호: 62-50-0): 모든 조직
Ethylnitrosourea(CAS 번호: 759-73-9): 간, 위, 십이지장, 공장
Methylmethanesulfonate(CAS 번호: 66-27-3): 간, 위, 십이지장, 공장, 폐, 기관지폐포세척(BAL)세포, 신장, 방광, 정소, 골수/혈액
N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(CAS 번호: 70-25-7): 위, 십이지장, 공장
1, 2-Dimethylhydrazine2HCl(CAS 번호: 306-37-6): 간, 소장
N-methyl-N-nitrosourea(CAS 번호: 684-93-5): 간, 골수, 혈액, 신장, 위, 공장, 뇌

3.3 시험물질의 투여

시험물질 투여는 시험물질이 인체에 노출되는 예상 경로를 고려하여 결정한다. 어떤 경로를 선택하든지 표적조직에 충분한 노출이 보장되는 경로를 선택해야 한다. 조직은 단일세포/핵의 부유액을 얻을 수 있으면 어떤 조직(주 1)에도 적용할 수 있다. 투여용량은 동물의 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않아야 하지만, 수용액의 경우 최대 2 mL/100 g이 사용될 수 있다. 1 회 투여를 원칙으로 하지만, 필요에 따라 연속투여를 할 수도 있다.

3.4 투여일정 및 표본채취

최적의 시료채취시간은 시험물질 또는 시험경로에 따라 다를 수 있으나 가급적 빨리하는 것이 좋다. 약물동태데이터가 없는 경우, 유전독성을 측정하기 위한 적절한 시점은 2 회 이상 투여할 때는 마지막 투여 후 2 시간 ~ 6 시간에 한 번, 또 단회 투여할 때는 투여 후 2 시간 ~ 6 시간과 16 시간 ~ 26 시간에 한 번씩 총 2 번 시료채취 한다. 그러나 개체마다 투여(2 회 이상 투여할 때는 마지막 투여)에서 부검까지의 시간이 같도록 배치하여야 한다. 1 일 2 회로 나누어 투여할 때는 투여간격은 2 시간 ~ 3 시간 이상이 되지 않게 분할투여 한다. 표적장기의 독성 작용발현에 대한 정보도 적절한 시료채취시점을 선택하는 데 활용될 수 있다.

3.5 관찰사항

동물의 건강에 관련된 일반적인 임상증상관찰은 하루에 적어도 2 회, 투여 후 예상되는 반응최대시간을 고려하여, 가능하면 매일 같은 시간에 시행하고 기록한다. 투

여기간 동안 최소 하루에 2 회 일반증상과 사망률을 조사한다. 장기시험의 경우 각 개체 모두에 대해 적어도 일주일에 한 번 이상, 그리고 시험기간의 종료 시에 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 사료를 교환할 때마다, 그리고 적어도 주 1 회 이상 측정한다. 시험물질을 음용수에 섞어 투여하는 경우, 음용수 섭취량은 음용수를 교환할 때마다, 그리고 적어도 주 1 회 이상 측정한다.

3.6 조직채취

기본 정보가 없거나 표적조직이 특별히 설정되어 있지 않은 경우는 간으로부터 조직시료를 채취하는 것이 타당하다. 때에 따라서는 시험물질이 직접 접촉하는 부위(예를 들어, 경구투여 경우에는 위, 십이지장 또는 공장, 흡입 노출의 경우에는 폐)에서의 시료채취를 고려하는 것이 가장 적절하다.

3.7 표본제작

부검 후 각 조직을 적출하는 데 걸리는 시간, 각 조직을 처리하여 세포 또는 핵의 부유액을 조제하는 데 걸리는 시간 및 부유액을 처리하고 슬라이드를 제작하는 데 걸리는 시간은 모두 중요한 변수로 간주된다.

- (1) 선택한 조직을 적출하여 절단하고 일부를 코멧시험용으로 채취하며, 세포나 핵 가운데 어느 쪽을 사용해도 무방하다. 세포 또는 핵을 분리하는 방법이 달라도 된다. 코멧시험용 조직을 균질화용 완충액에 넣어 차가운 균질화용 완충액(mincing buffer)으로 충분히 세척하여 잔류혈액을 제거한 후 작업까지 차가운 균질화용 완충액에 저장한다.
- (2) 슬라이드 표본을 제작하는 저융점 연한천의 최종농도는 0.45 %보다 낮아지지 않도록 하며, 세포나 핵이 준비된 이후 1 시간 이내에 제작한다. 세포밀도가 적절한지 아닌지는 코멧의 측정에 사용되는 이미지 분석시스템에 따라 결정된다.
- (3) 세포용해조건은 중요한 변수이며, 이는 DNA 변이의 특정 형태로부터 유래한 DNA 가닥의 절단을 방해할 수도 있다. 제작한 슬라이드 표본은 2 ℃ ~ 8 ℃ 조건의 냉장 세포분해용액 중에 한 시간 이상 담가 놓아야 하며(반응 단계), 자외선성분을 포함한 빛의 노출을 최대한 억제할 수 있는 조명 조건에서 진행한다. 반응 단계가 끝나고 표본을 정제수, 전기영동완충액, 중화완충액 또는 인산완충액을 사용하여 세척한다.

- (4) 만약 동결조직이나 세포핵을 사용할 경우, 동결방법의 능력을 입증하고, 용매처리군의 표적조직에서 양성반응을 검출할 수 있는지 확인해야 한다.

3.8 전기영동

전기영동을 실시할 때마다 각 실험동물로부터 제작한 슬라이드 표본 수가 같아야 하고, 각각의 용량군과 음성대조군 및 양성대조군에서 채취한 시료가 같이 포함되도록 슬라이드를 무작위 배치한다.

- (1) 슬라이드 표본은 DNA 가닥의 풀림을 위해 적어도 20 분간 전기영동 장치에 방치한 후 전기영동을 실시한 후(0.7 V/cm 조건으로 약 20 분) 중화완충액으로 세척한다. DNA의 이동수준은 전기영동 시간과 전위(V/cm)와 직선적 상관관계가 있고, 정량 범위가 최적화되도록 전기영동 시간을 설정한다.
- (2) 전기영동완충액의 온도는 가닥 풀림 시간 및 전기영동 시간 동안 저온(일반적으로 2 °C ~ 10 °C)으로 유지한다. DNA 가닥의 풀림이 시작될 때와 전기영동의 시작 및 종료 시점의 전류와 온도를 기록한다.
- (3) 전기영동이 완료된 후 슬라이드 표본 세척하기를 반복하고, 겔을 염색한 후 바로 측정하거나, 나중에 측정하여도 되는 데 이때는 겔을 무수에탄올에 적어도 5 분간 잠기게 함으로써 탈수한다.

3.9 분석

- (1) 자동 또는 반자동 이미지 분석장치를 이용하여 코멧을 정량적으로 측정한다. 슬라이드 표본은 형광염색액으로 염색하고 에피-형광장치와 검출기 또는 디지털카메라를 갖춘 현미경을 사용하여 적절한 배율로 측정한다.
- (2) 세포는 코멧 이미지 북에 그려진 그림 모양에 따라 “계수가능(scorable)”, “계수불가능(non-scorable)”, “유령세포(hedgehog)”로 분류된다. 오류(artefacts)를 피하기 위해 측정 가능한 세포만을 꼬리 DNA 백분율의 측정에 사용한다. 계수 불가능한 세포는 빈도를 보고할 필요가 없으며, “유령세포”의 발생에 대해 기록하고 보고해야 한다. 출현빈도는 한 개 시료 당 최소 150 개 세포를 육안으로 측정하여 산출하고 별도 기재한다. 표본은 맹검(blind test)에 적합하도록 번호를 부여하고 수동 혹은 자동으로 분석한다. 시료마다 적어도 150 개 세포(유령세포 제외)를 분석해야 한다.

- (3) 슬라이드 표본을 이용하는 경우는 만약 한 군 당 동물 5 마리를 사용하였다면, 한 개 시료 당 2 장 또는 3 장의 슬라이드 표본을 계수하면 된다. 슬라이드 표본의 관찰은 코멧 꼬리가 겹치지 않는 부위의 여러 곳에서 실시한다. 슬라이드 표본의 가장자리 부분에서의 계수는 피한다.
- (4) 코멧분석에서 DNA 가닥의 절단은 꼬리 DNA의 백분율, 꼬리의 길이, 꼬리의 모멘트 등의 독립적인 지표에 의해 측정된다. 결과의 평가 및 해석에는 꼬리 DNA 백분율을 사용하는 것이 권장된다. 단 랫드의 간을 사용한 경우 대조군의 꼬리 DNA 백분율의 중앙값 평균이 6 %를 넘지 않아야 한다.
- (5) DNA 이동이 증가한 경우에는 하나 이상의 세포독성 지표에 대해 검토해 보는 것을 권고되며, 세포독성의 명백한 증거가 있는 경우, DNA 이동의 증가는 유전 독성인지 세포독성인지 신중하게 해석되어야 한다.
- (6) 병리조직학적 변화(염증, 세포침윤, 세포사멸 또는 괴사 변화 등)는 조직의 독성을 확인하는 적절한 지표로 간주되고 있다. 혈액생화학측정(예. AST, ALT)의 변화도 조직손상에 대한 유용한 정보를 얻을 수 있으며, caspase활성, TUNEL 염색, AnnexinV염색 등의 부가적인 지표도 추가적인 조직손상에 대한 유용한 정보를 제공한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

- (1) 실험의 단위가 동물이므로 개체 동물마다 시험자료와 요약한 결과 모두를 표 형식으로 제시해야 한다. 데이터는 계층적 성격을 가지고 있으므로 슬라이드 표본 당 꼬리 DNA 백분율의 중앙 값을 산출하고, 각 동물에 대한 꼬리 DNA 백분율의 중앙 값의 평균 값을 산출한다. 각 개체의 평균치로부터 실험동물군의 평균 값을 산출한다.
- (2) 모든 승인기준을 만족하면서 다음 사항에 적절한 경우 시험물질은 분명한 양성 물질 또는 음성물질로 판정한다.
 - a) 시험에 사용된 용량 중 적어도 하나의 용량에서 동시음성대조군보다 통계학적으로 유의한 증가를 보이는 경우에는 양성물질로 하며, 보이지 않을 경우 음성 물질로 한다.

- b) 이 증가를 적절한 경향검증으로 평가하여, 용량-의존성을 보이는 경우에는 양성 물질로 하며, 보이지 않을 경우 음성물질로 한다.
 - c) 상기 결과는 시행된 동물종, 용매(보조제), 투여경로, 조직 및 투여횟수에서 음성 대조군의 과거 데이터 범위 밖에 존재할 경우에는 양성물질로 하고 범위 내에 존재할 경우에는 음성물질로 한다.
 - d) 표적조직에서의 노출과 표적조직에 대한 독성을 뒷받침할 직간접적인 증거가 있으면 음성물질로 한다.
- (3) 양성 또는 음성의 충분한 정보가 없을 시 판정불가로 결론을 내릴 수 있다.

2. 시험의 성립기준

다음의 기준으로 시험이 적절히 수행되었는지 판단한다.

- (1) 동시음성대조군의 자료가 기존 대조군 자료에 부합
- (2) 동시양성대조군의 자료가 기존 대조군 자료에 부합하고, 음성대조군과 확실한 통계적 차이를 나타냄
- (3) 투여군 및 결과분석용 세포수가 적절함
- (4) 용량설정 기준에 따라 최고투여용량이 설정됨

3. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질 정보

- (1) 화학적 동일성 데이터(IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 현실적으로 가능하다면 불순물의 화학적 동정 등)
- (2) 물리적 특성(외관, 수용성 및 기타)과 순도
- (3) 이화학적 성상
- (4) 시험물질의 안정성
- (5) 사용 기간 또는 재분석 날짜(가능할 시)

3.4 용매 정보

- (1) 종류 및 선택근거
- (2) 시험물질의 용해성 및 안정성(가능할 시)
- (3) 조제법 및 투여액의 분석결과(예. 안정성, 균일성, 농도 등)

3.5 실험동물에 관한 정보

- (1) 동물의 종/계통 및 선택의 타당성
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구매처, 사육조건, 사료, 영양물질
- (4) 동물 식별방법
- (5) 동물의 체중 범위, 그룹별 평균 및 표준편차를 포함하여 시험을 시작 및 종료할 때 동물의 개별 중량, 1 주 이상 연구의 경우 연구 중 개별 동물의 체중

3.6 시험조건

- (1) 양성대조 및 음성대조(용매/보조제)의 데이터
- (2) 용량선정 시험결과(실시한 경우)
- (3) 투여용량 설정 근거
- (4) 투여경로 설정 근거 및 투여방법, 투여일정, 투여부위(피하, 정맥 등) 검체처리, 양성반응을 나타낸 조직의 조직학적 분석
- (5) 사료 및 음용수 성적서, 농도, 용량
- (6) 시료 조제방법
- (7) 독성의 관찰 또는 측정방법, 동물 당 관찰세포수
- (8) 표본 제작방법
- (9) 동물 당 관찰 세포수
- (10) 양성(또는 위양성) 및 음성 판단기준
- (11) 시험물질이 표적장기에 도달했다는 것을 증명하기 위한 방법
- (12) 안락사방법 및 진통방법, 부검 및 안락사 시점
- (13) 표본추출 및 보존절차
- (14) 시험의 성립기준
- (15) 전기영동 조건
- (16) 이용한 염색법
- (17) 코멧의 측정 및 계수(scoring)방법, 관련 소프트웨어

3.7 시험결과

- (1) 개별 실험동물에 대한 시험 전과 시험기간 동안의 일반 임상관찰을 한 경우에는 그 결과
- (2) 세포독성의 증거(수행된 경우)
- (3) 시험의 투여기간이 1 주일을 초과하는 경우: 각 군의 체중 범위, 평균, 표준편차를 포함한 시험의 각 개체의 체중, 섭취량
- (4) 용량-반응관계
- (5) 조직/개체 당 꼬리 DNA 백분율 중앙 값 및 슬라이드 표본 당, 동물 당, 군 당 평균
- (6) 평가 조직마다 범위, 중앙 값의 평균 값, 표준편차, 동시 및 과거 음성대조군 데이터, 동시 및 과거양성대조군 데이터
- (7) 양성대조군을 이용한 용량-반응곡선(간 이외의 조직일 시)
- (8) 적용한 통계분석 및 방법
- (9) 양성, 음성 또는 판정불가를 판정할 때의 기준
- (10) 각 군 및 동물 한 마리를 기준으로 유령세포의 출현빈도

3.8 시험결과에 대한 고찰 및 결론

(주 1) 적용 가능 조직

- (1) 간, 위장, 공장, 신장, 피부, 방광, 폐 및 기관지폐포세척세포(BAL 세포)
- (2) 소화관 부위의 경우 고농도 시험물질의 노출은 제한됨.
- (3) 생식세포의 경우 DNA 절단을 측정하는 데 적합하지 않아 생식기 역시 이 시험법에 적용하는데 제한적임.
- (4) 간 이외의 조직에서 양성대조군 및 음성대조군의 범위 등은 확립되어 있지 않음. 간의 경우, 음성대조군 값의 하한이 확립되어 있지 않음.

제40항 비설치류에 대한 90 일 반복경구투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 비설치류에 시험물질을 90 일 동안 경구로 투여한 후 생체에 미치는 기능 및 형태 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성, 표적기관 및 축적가능성 등을 평가하고 아울러 만성독성시험 및 인체노출 안전기준의 설정에 필요한 투여용량 수준을 선정하고, 무영향관찰용량의 추정 값을 제공하는 데 그 목적이 있다.

2. 정의

2.1 용량(Dose)

투여된 시험물질의 양. 시험물질의 질량(g, mg), 실험동물의 단위 체중 당 시험물질의 질량(예, mg/kg), 또는 사료 중의 일정 농도(ppm)로 표시

2.2 투여법(Dosage)

용량, 투여빈도 및 투여기간을 포함하는 일반적인 용어

2.3 무영향관찰용량(NOAEL)

시험물질 노출과 관련된 유해조건이 관찰되지 않는 최고용량. 노출량-반응시험에서 노출집단과 적절한 무처리집단 간 악영향의 빈도나 심각성이 통계적으로 또는 생물학적으로 유의한 차이가 없는 노출량

II. 시험

1. 원리

최소 3 개 용량 이상의 다양한 용량의 시험물질을 90 일 동안 실험동물에 매일 경구 투여하고, 투여기간 중 독성징후를 관찰하며 시험기간 중 사망한 동물 및 생존 동물을 부검하여 혈액학적, 혈청생화학적, 조직병리학적 및 임상병리학적 검사를 하여 독성을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

- (1) 일반적으로 사용되는 비설치류는 개이며 품종이 확실한 것으로 하되 주로 비글 개를 사용한다. 돼지, 미니 돼지 등 다른 종을 사용할 수도 있다. 영장류 사용은 권장되지 않으며 이를 사용하는 경우에는 그 타당성을 제시하여야 한다. 건강한 젊은 성체 동물을 사용하며, 개의 경우 4 개월령 ~ 6 개월령에서 투여를 시작하는 것이 좋다. 최대 9 개월령을 넘지 않는 것을 사용한다. 장기만성독성 시험의 예비시험으로서 별도의 시험을 시행하는 경우에는 예비시험 및 본 시험에서 사용할 실험동물종을 사용한다.
- (2) 실험동물은 대조군과 투여군에 무작위로 할당되며, 사육 케이지의 배치로 인해 동물에게 미칠 수 있는 영향을 최소화한다. 순화기간은 선택한 시험종과 그 공급원에 따라 다를 수 있으나, 개 및 실험용 돼지가 해당 시설의 자체 사육시설로부터 공급되는 경우에는 5 일 이상, 이 동물이 시험기관의 외부에서 공급되는 경우에는 2 주 이상 순화시킬 것이 권장된다. 동물마다 고유의 식별번호를 부여한다.
- (3) 각 투여용량에서 최소 8 마리의 동물(암컷 4 마리, 수컷 4 마리)을 사용하며 중간에 안락사하여 검사하는 경우에는 계획부검에 필요한 수를 미리 추가한다. 회복군으로는 화학물질의 노출을 종료한 다음 독성영향의 가역성이나 지속성을 관찰하기 위해 대조군 및 최고용량군에 추가로 8 마리(암수 각 4 마리)로 구성된 회복군을 둘 수 있다. 회복기간은 관찰되는 영향을 고려하여 적절히 정한다.

2.2 사육조건

조명은 인공조명으로 12 시간 간격으로 명암을 조절한다. 사료는 일반적으로 넠리쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취 가능하도록 한다.

2.3 시험물질

시험물질은 적당한 용매(부형제)에 용해 또는 현탁시킨다. 가능한 수용액 또는 수성현탁액을 먼저 선정하여 사용하고, 그 후에 오일(옥수수 기름 등)의 용액이나 현탁액을 선정하며 그 외의 용매(부형제)는 마지막으로 선정하는 것이 바람직하다. 물 이외의 용매를 사용하는 경우에는 용매의 독성을 알고 있어야 한다. 또한, 투여 조건에서의 시험물질의 안정성을 분석한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 투여

- (1) 시험물질은 사료나 음용수에 혼합하여 투여할 수 있으며, 위관투여법이나 캡슐에 봉입하여 투여할 수도 있다. 경구투여 방법은 시험목적 및 시험물질의 물리·화학적 성상에 따라 적절히 선택한다. 90 일 동안 매주 7 일간 매일 투여한다. 주 5 일 투여와 같은 다른 투여요법을 시행할 때는 그 정당성이 입증 되어야 한다.
- (2) 위관투여법으로 투여할 때는 단일용량 단위로 시행된다. 1 회에 투여 가능한 최대 투여액량은 실험동물의 크기에 따라 다르지만, 일반적으로 투여액량은 가능한 한 적은 양으로 설정한다. 매일 비슷한 시간에 투여하며, 동물의 체중을 고려한 일정 투여량 수준을 유지하기 위해 투여액량은 필요에 따라 조정할 수 있다.
- (3) 최소 3 단계 투여량의 시험군과 대조군을 이용한다(한계시험이 시행되는 경우 제외). 대조군은 미투여 시험군이거나 용매-대조군이어야 하며, 시험물질을 처리하는 것 외에는 대조군에 속하는 동물은 시험군에 속하는 동물과 같이 취급되며, 용매(부형제)를 사용할 경우 대조군은 시험군에 사용된 용매(부형제)의 최고투여액량 단위로 투여한다.
- (4) 투여용량은 반복투여량 또는 용량설정시험의 결과를 기준으로 하며 기존의 독성학적 및 독성동태학적 데이터를 고려한다. 최고용량은 독성이 나타나는 용량을 목표로 선택한다. 최소용량에서 용량상관성 반응 및 무해용량을 입증하기 위해 투여량 수준은 2 배 ~ 4 배 간격의 내림차순으로 선택한다.
- (5) 시험물질을 사료와 혼합하여 투여할 경우에는 시험물질이 섞인 사료의 섭취량이 줄어들면 사료의 섭취량을 고려한 짝-식이공급형(Pair-fed) 대조군을 둔다. 사료나 음용수에 혼합하여 투여된 시험물질은 정상적인 영양 및 물의 체내 균형을 방해하지 않아야 하며 일정한 사료농도(ppm)나 동물의 체중을 고려한 일정 투여량이 사용될 수 있다.

3.2 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg과 동등한 한 개 용량에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 시험물질의 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험을 수행할 필요는 없다. 사람에게

노출되는 경우 더 높은 투여량이 사용될 가능성이 없을 때는 한계시험을 적용할 수 있다.

3.3 관찰사항

- (1) 관찰기간은 최소 90 일로 한다. 가능한 매일 같은 시간에, 투여 후 예상 영향이 최대로 나타나는 기간을 고려하여 관찰한다. 동물의 일반증상은 최소 1 일 2 회, 통상 매일 관찰하며 시작할 때와 끝날 때 독성증상과 사망률의 징후에 대해 관찰하고 기록한다. 모든 동물에 대한 상세한 증상관찰은 최초 노출 전 최소 1 회, 그 후 주 1 회 시행하여 기록한다. 관찰사항은 (주 1)에 나타나 있다.
- (2) 관찰조건의 변동이 최소가 되도록 한다.
- (3) 시험물질 투여 전과 시험 종료 시, 검안경이나 적합한 장비를 이용하여 고용량 투여군 및 대조군에 대해 반드시 안과학적 검사를 시행하며, 눈에서 변화가 검출되면 모든 동물에 대해 검사를 시행한다.
- (4) 모든 실험동물의 체중과 사료 섭취량은 최소 주 1 회 측정한다. 단, 시험물질을 음용수에 혼합하여 투여할 경우에는 음용수 섭취량을 최소 주 1 회 측정한다. 동물의 음용수 섭취 행동에 이상이 보이는 경우에는 시험물질이 사료 또는 경구투여용 튜브를 통해 투여될 경우라도 음용수 섭취량을 측정할 필요가 있다.

3.4 검사항목

3.4.1 혈액학적 검사

시험종료 시 동물을 부검하기 직전에 혈액을 채취한다. 혈액샘플을 채취하기 전 하룻밤 동안 절식시키며, 시험기간 중 혈액샘플을 채취할 때는 다음의 항목을 검사 한다. 적혈구용적률, 혈색소량, 적혈구수, 총백혈구수, 백혈구감별계수, 혈소판수 및 혈액응고에 관한 항목(응고시간, 프로트롬빈시간, 트롬보플라스틴시간 등)

3.4.2 생화학적 검사

- (1) 시험종료 시 획득한 혈액샘플에 대한 생화학적 검사를 수행한다. (주 2)
- (2) 시험의 시작 단계, 중간 및 마지막 단계에 채취한 소변에 대해 다음과 같은 항목을 측정한다. 정상, 요량, 삼투압 또는 비중, pH, 뇨단백, 뇨당 및 혈액/혈구
- (3) 시험물질이 대사 측면에 영향을 미칠 수 있으면 다음과 같은 항목을 포함한다. 갈슘, 인산염, 염화물, 나트륨, 칼륨, 공복 시 혈당, 알라닌아미노전달효소, 아스

파테이트전달효소, 오르니틴탈카르복실화효소, 감마글루타밀트랜스펩티다아제, 요소질소, 알부민, 혈중크레아티닌, 총빌리루빈, 총혈청단백질 등

3.4.3 조직병리학적 검사

- (1) 시험에 사용된 모든 동물은 상세한 육안부검을 시행하며 모든 병리학적 변화를 기록한다. 모든 동물의 간(담낭 포함), 신장, 부신, 고환, 부고환, 자궁, 난소, 갑상샘(부갑상샘 포함), 흉선, 비장, 뇌, 심장은 부착조직을 제거한 다음 가능한 빨리 습중량을 측정한다. 빈사 상태 또는 중간에 사망하였다고 판명된 것은 제외한다. 조직병리학적 검사를 위해서 기관·조직을 적당한 보존액 중에서 보존한다. (주 3)
- (2) 대조군 및 고용량 투여군의 모든 동물의 보전된 기관 및 조직에 대해 완전한 조직병리학적 검사를 수행한다. 전체병변을 검사한다. 고용량 투여군에서 시험물질과 관련된 변화가 관찰된 장기에 대해서는 모든 투여군의 동물에 대해 시행되어야 한다. 회복군에서는 시험군에서 영향이 나타나는 조직 및 기관에 대해 조직병리학적 평가를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 데이터는 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다.
- (2) 시험시작 시 동물의 수, 시험 중 사망했다고 판명되었거나 인도적 이유로 안락사한 동물의 수 및 안락사를 시킨 시간, 독성징후를 나타낸 동물의 수와 시작시각, 지속기간, 독성영향의 심각도를 포함한 독성징후에 대한 설명, 독성소견을 나타내는 동물의 수와 독성소견의 유형, 각 독성소견 유형을 나타내는 동물의 백분율을 나타낸다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질 정보

- (1) 물리·화학적 특성과 순도
- (2) 확인시험 데이터

2.4 물이 아닌 다른 용제를 선택한 경우 그 종류 및 선정근거

2.5 실험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구매처, 사육환경, 사료 등
- (4) 동물의 체중 범위, 군별 평균 및 표준편차를 포함하여, 시험시작 및 종료 시의 동물의 개별 중량
- (5) 사용한 종에 대한 근거 및 적정성에 대한 타당성

2.6 시험조건

- (1) 투여용량선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 제형/사료 조제내용, 최종농도, 안정성과 동질성(균질성)
- (3) 시험물질의 투여 내용에 대한 세부사항
- (4) 실제 투여량(mg/kg (체중)/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사료 및 음용수 품질에 관한 사항

2.7 결과

- (1) 체중/체중 변화
- (2) 사료 섭취량과 음용수 섭취량
- (3) 독성징후를 포함한 성별 및 용량별 독성반응 자료
- (4) 부검소견
- (5) 임상 관찰의 성격, 심각도와 지속기간(가역성 여부 무관하게)
- (6) 안과학적 검사의 결과

- (7) 감각적 활동, 그립 강도 및 운동 활동 평가(가능한 경우)
- (8) 관련 기준 값을 이용한 혈액학적시험결과
- (9) 관련 기준 값을 이용한 임상 생화학시험결과
- (10) 시험 종료 시의 체중, 기관의 중량 및 기관/체중의 비율
- (11) 모든 병리조직학적조사결과에 대한 상세한 설명
- (12) 흡수량 자료(가능한 경우)
- (13) 결과의 적절한 통계적 처리

2.8 결론

주 1) 관찰사항

- (1) 관찰 시 목격된 징후
- (2) 피부, 털, 눈, 점막 변화, 분비물과 배설물 발생
- (3) 자율신경반응(예. 눈물분비, 경직, 동공 크기, 이상한 호흡패턴)
- (4) 간헐적 경련성 및 강직성 안구 운동, 정형적인 거동 및 특이한 행동, 걸음걸이, 자세, 취급에 대한 반응

주 2) 혈액샘플에 대한 임상 생화학 측정 항목

- (1) 나트륨, 칼륨, 공복 시 혈당, 요소, 크레아티닌, 총단백질 및 알부민, 총빌리루빈
- (2) 간세포영향을 나타내는 아래 효소 중 2 개 이상
(예) 알라닌아미노전달효소, 아스파르테이트아미노전달효소, 감마글루타밀트랜스펩티다아제, 오르니틴탈카르복실화효소
- (3) 특정 상황에서 추가 효소(간 또는 다른 데서 유래한) 및 담즙산
- (4) 일반조직손상

주 3) 조직의 유형 및 후속 병리조직학적검사를 위해 보존할 필요가 있는 조직 목록

병소가 관찰된 조직, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교를 포함한 대표부위), 척수(경부, 중간 흉부, 요추), 뇌하수체, 갑상샘, 부갑상샘, 흉선, 식도, 침샘, 위, 대장(페이에르판(Peyer's patches) 포함), 소장, 간, 췌장, 신장, 부신, 비장, 심장, 기도, 폐, 대동맥, 생식샘, 자궁, 보조 성 기관, 암컷의 유선, 전립선, 방광, 담낭, 림프절(투여경로 부근 및 투여경로에서 멀리 위치한 것), 근육과 근접한 말초신경(좌골 또는 경골), 골수, 피부와 눈, 시험물질의 표적기관이 될 가능성이 큰 기관

제41항 병합 생식/발달 독성 선별 시험 및 반복투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 랫드에 시험물질을 투여한 후 생체에 미치는 기능 및 형태 변화를 관찰함으로써 시험물질의 독성, 표적기관 및 축적가능성 등의 반복 투여 독성과, 성선 기능, 교배 행동, 임신, 태자 발달, 분만 등의 생식/발달 독성 및 내분비 교란 영향을 병합하여 평가하는 데에 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 용량

투여된 시험물질의 양. 시험물질의 질량(g, mg), 실험동물의 단위 체중 당 시험물질의 질량(예: mg/kg), 또는 사료 중의 일정 농도(ppm)로 표시

2.2. 투여용법

용량, 투여빈도 및 투여기간을 포함하는 일반적인 용어

2.3. 무영향관찰용량(NOAEL)

시험물질 노출과 관련된 유해조건이 관찰되지 않는 용량 중 최대용량

2.4. 발달 독성

차산자의 생후, 산후, 구조 또는 기능 장애를 나타내는 생식 독성의 발현

2.5. 번식능 장애

수컷 또는 암컷의 생식 기능 또는 능력 장애

2.6. 모체 독성

직접적 혹은 간접적으로 임신 상태와 관련되어 발생하는 임신한 암컷에 대한 악영향

2.7. 생식 독성

차산자에 대한 유해한 영향 및 수컷과 암컷의 생식 기능 또는 능력의 손상

II. 시험

1. 원리

본 시험은 수컷(최소 28 일간 시험물질 노출) 및 암컷(최소 63 일간 시험물질 노출) 랫드에서 시험물질의 반복 노출로 나타날 수 있는 건강 유해성 정보를 제공한다. 90 일 시험이 필요하지 않은 시험물질의 시험, 장기시험의 예비시험 등으로서의 반복 투여 독성 시험 자료로 활용될 뿐 아니라, 생식/발달 독성 선별 시험 정보로 활용된다. 시험물질이 잠재적으로 생식선 기능이나 교배 행동, 수정, 태자 발달 및 분만과 같은 수컷과 암컷의 번식 능력에 미칠 영향에 대한 정보를 제공할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

- (1) 일반적으로 랫드를 사용한다. 다른 종을 사용하는 경우에는 타당성을 제시하여야 한다. 번식능력이 부족하거나 발달 장애의 빈도가 높다고 잘 알려진 계통(strains)은 사용하지 않는다. 건강한 젊은 성체 동물을 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다.
- (2) 실험동물은 대조군과 투여군에 무작위로 할당되며, 사육 케이지의 배치로 인해 동물에게 미칠 수 있는 영향은 최소화한다. 최소 5 일간 순화기간을 두며, 동물마다 고유의 식별번호를 부여한다.
- (3) 각 시험군은 최소 10 마리의 수컷, 12 마리 ~ 13 마리의 암컷으로 구성 한다. 암컷은 성 주기에 대한 사전 노출 평가를 받고 전형적인 4 일 ~ 5 일의 성 주기를 나타내지 않는 동물은 시험에서 배제한다. 이 때문에 각 군 당 10 마리의 암컷을 확보하기 위해 여분의 암컷 사용을 고려하는 것이 추천된다. 독성 영향이 심하게 나타나는 경우를 제외하고 대개 군 당 8 마리 가량 수태할 것으로 추정되며, 이 정도가 최소 필요한 수태 모체 수가 된다. 만약 중간 부검이 필요하다면, 필요한 동물 수를 추가로 고려한다. 처리 후 최소 14 일 동안 가역성, 전신 독성의 지속적 혹은 만성적 발생의 관찰을 위하여 대조군과 최고 용량 시험군에 성별 당 5 마리의 추가 위성 시험군(additional satellite group)을 고려한다. 위성 시험군의 동물은 교배과정을 거치지 않으며 결과적으로 생식/발생 독성의 평가에 사용하지는 않는다.
- (4) 투여 시작 전에 일정한 주기를 가진 암컷을 선별하기 위해 성 주기를 관찰한다. 투여 시작부터 교배의 증거가 있기 전까지 질 도말 표본을 모니터링 한다.

2.2. 사육조건

- (1) 모든 절차는 해당 실험동물 관리기준을 준수한다. 동물실 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지하며, 청소 시를 제외하고 상대 습도는 30 % 이상, 70 % 이하로 유지한다. 조명은 인공조명으로 12 시간 간격으로 명암을 조절한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취 가능하도록 한다.
- (2) 동물들은 개체별로 사용하여야 한다는 과학적 근거가 있지 않은 한, 같은 성별의 소규모 집단으로 사육한다. 케이지 당 5 마리 이상의 동물이 수용되지 않도록 한다. 교배 절차는 목적과 맞게 케이지 안에서 이루어져야 한다. 수태한 암컷은 개별적으로 사육하며, 수태와 분만을 위한 환경(nesting materials)을 제공한다. 수유 중인 암컷은 새끼들과 함께 개별적으로 사육한다.

2.3 시험물질

시험물질을 적합한 용매에 녹이거나 현탁시킨다. 가능한 한, 수용성의 용액/현탁액을 우선적으로 고려한다. 차선택으로 유성(예: 옥수수 기름) 용액/현탁액을 고려하며, 다음으로 다른 용매 중에서 가능한 용액을 고려한다. 비수성 용매를 이용하는 경우, 해당 용매의 독성 정보가 필요하다. 용매 내 시험물질의 안정성과 균일성이 확립되어야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험물질의 투여

3.1.1. 투여경로

- (1) 이 시험법에서는 시험물질의 위관투여법을 이용한 경구투여를 기본으로 한다. 필요한 경우, 사료나 음용수를 통해 투여할 수도 있다. 매주 7 일간 매일 투여한다.
- (2) 위관투여법을 이용할 경우, 위장 튜브나 적합한 삼관을 통해 시험물질을 한 번에 투여한다. 한 번에 투여할 수 있는 최대 투여액량은 실험동물의 크기에 따라 다르지만, 100 g 체중 당 1 mL를 초과하지 않도록 하되, 수용액일 경우 2 mL/100 g 까지 가능하다. 고농도에서 심각한 영향을 미치는 자극성이나 부식성 시험물질을 제외하고, 모든 용량 수준에서 일정한 투여액량을 갖도록 시험물질 농도를 조절한다.
- (3) 시험물질이 사료나 음용수를 통해 투여되는 경우, 시험물질의 양이 정상적인 영양이나 음용수 균형을 해치지 않는 것이 중요하다.

3.2.2. 투여용량

- (1) 일반적으로 최소 3 개의 시험군과 1 개의 대조군을 둔다. 만약 적합한 일반 독성 시험 결과가 없다면, 용량 범위 결정 시험(range finding study)을 수행할 필요가 있으며, 같은 공급처의 같은 계통 동물을 사용한다. 시험물질의 처리를 제외하고 대조군의 동물들은 시험군과 같은 방식으로 다룬다. 만약 시험물질을 투여하는데 용매(vehicle)가 사용된다면 사용되는 투여액량 중 가장 높은 투여액량의 용매를 대조군에게도 투여한다.
- (2) 용량 수준은 기존 독성 및 독성동태학 자료를 고려하여 선택한다. 수태한 동물과 수태하지 않은 동물 사이에 민감도 차이가 있을 수 있다는 점도 고려한다. 최고 투여량 수준은 독성 영향을 유발할 목적으로 선택해야 하지만 사망이나 명백한 고통은 유발하지 않도록 한다. 가장 낮은 용량 수준에서 부작용을 나타내지는 않으나, 용량-반응 관계를 나타낼 수 있는 내림차순의 용량 수준을 선택하도록 한다. 대개 2 배 내지 4 배 간격이 적합하며, 4 번째 시험군을 추가할 경우 투여량 사이에 매우 큰 간격(예를 들어, 10 배 이상)을 두도록 한다.

3.2.3. 투여일정

- (1) 최소 5 일간의 순화 기간 및 약 2 주간 암컷의 성 주기를 점검한 후, 교배 2 주 전에 암수 모두에게 시험물질 투여를 시작한다. 새끼와 어미는 분만 후 13 일에 혹은 그 직후에 안락사 시킨다. 교미(copulation)의 증거가 없는 암컷들은 교배 기간의 마지막 날 후로부터 24 일 ~ 26 일에 안락사 시킨다. 투여는 교배 기간 동안 암컷, 수컷에서 모두 지속한다. 수컷에게는 최소 투여기간이 28 일이 될 때까지 교배 기간 후에도 추가 투여한다. 이후 안락사 시키거나, 필요한 경우 두 번째 교배를 위해 투여를 계속한다.
- (2) 수컷의 사전 교배 투여 기간이 제한되어 있으므로, 수정 능력으로 고환 독성을 민감하게 평가하기는 어려울 수 있으며, 고환에 대한 상세한 조직학적 검사가 필수적이다. 교배 전 2 주 노출, 교배 전후 최소 4 주간의 노출 및 교배/수정 능력 관찰, 수컷 생식선에 대한 상세한 조직병리학적 검사들을 병합하여, 수컷의 수정 능력과 정자발생에 대한 전반적인 영향을 파악할 수 있다.
- (3) 암컷은 시험 기간 내내 투여한다. 교배 전 2 주(적어도 2 번의 성 주기를 포함), 수태시간까지의 가변적 시간, 수태기간, 분만 후 최소 13 일, 예정된 사망 전일까지 투여를 지속한다. 전체적인 투여 기간은 암컷에 따라 다를 수 있으나

대략 63 일이 되며, 교배 전 최소 14 일, 최대 14 일간의 교배, 수태기간 22 일, 수유기간 13 일 정도에 해당한다. 시험물질을 흡입이나 피부를 통해서 투여하는 경우, 투여는 적어도 수태 19 일까지 지속하며 투여는 가능한 빨리, 늦어도 분만 후 4 일째에는 재개한다.

- (4) 투여 기간 동안, 동물들의 독성 징후를 매일 상세히 관찰한다. 시험기간 중 폐사하거나 안락사 시킨 동물은 부검하고, 시험 종료 시까지 살아남은 동물들은 종료 시 안락사 시키고 부검한다.
- (5) 위성 시험군 동물들은 교배하지 않는다. 동물들은 암컷의 첫 번째 치사일로부터 최소 14 일 까지 관찰하고 독성 효과의 지연 발생이나 지속성, 회복 등을 판단하기 위하여 투여하지 않도록 한다.
- (6) 전체적인 투여 일정은 부록 1을 참고한다.

3.2. 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg과 동등한 용량 수준에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 시험물질의 독성이 예상되지 않는 경우 3 단계 용량을 사용한 시험을 수행할 필요는 없다. 사람에게 노출되는 경우 더 높은 투여량이 사용될 가능성이 없을 때는 한계시험을 적용할 수 있다.

3.3. 교배 과정 및 한배새끼(litter) 크기

3.3.1. 교배 과정

일반적으로 이 시험에서는 1:1(한 수컷 당 한 암컷)로 교배한다. 암컷은 교배의 증거가 관찰되거나 2 주가 경과할 때까지 동일한 수컷과 함께 둔다. 매일 아침마다 암컷들에게 정자나 질전(vaginal plug)의 존재를 확인한다. 질전이나 정자의 교배 증거가 발견된 날을 임신 0 일을 정의한다. 교배가 성공적이지 않으면 같은 시험군의 검증된 수컷과 암컷의 재교배를 고려할 수 있다.

3.3.2. 한배새끼 크기

- (1) 사용된 랫드 계통에서의 정상 한배새끼 크기에 따라, 대개 한배에 성별 당 4 마리 ~ 5 마리의 새끼를 생후 4 일째에 무작위로 선택하고, 그 외의 새끼들은 제외하여 각 배에서 나온 새끼 수를 조정한다. 2 마리의 여분 새끼에서 채혈하고 혈액을 합한 후, 혈청 갑상선호르몬을 측정한다. 체중 혹은 항문-성기 간 거

리(anogenital distance, AGD) 등에 근거하여 선별적으로 새끼를 제외하는 것은 적합하지 않다. 수컷 또는 암컷 새끼의 수가 한배에 각 성별 당 4 마리 ~ 5 마리가 되지 않는 경우에 부분적인 조정이 허용된다. 여분 새끼가 1 마리만 확보된다면, 1 마리에서 채혈하여 혈청 중 T4를 측정한다. 한배새끼 크기가 기준(8 마리 혹은 10 마리/배)보다 낮으면 새끼들을 제외하기 어려운 경우도 있다.

- (2) 만약 한배새끼 수를 조정하지 못했다면, 생후 4 일째에 한 배당 2 마리의 새끼에서 채혈하여 혈청 갑상선호르몬 농도를 측정한다.

3.3 관찰사항

- (1) 가능한 매일 같은 시간에, 투여 후 시험물질 영향이 최대로 나타날 것으로 예상되는 시간을 고려하여 관찰한다. 동물의 일반증상은 최소 1 일 1 회, 통상 매일 관찰하며 시작할 때와 끝날 때 독성증상과 사망률의 징후에 대해 관찰하고 기록한다.
- (2) 관찰조건의 변동이 최소가 되도록 하며, 관찰은 투여군에 대해 식별정보를 제공하지 않는 상태에서 실시한다.
- (3) 시험물질 투여 전과 시험 종료 시, 최소 일주일에 1 회 자세한 임상 관찰을 모든 부모 동물에서 수행한다. 특히, 피부, 털, 눈, 점막 등의 변화, 분비물 및 배설물의 발생과 자율신경 활동(예를 들어, 눈물샘, 눈꺼풀 처짐, 동공 크기, 비정상적인 호흡) 등을 주의하여 관찰한다. 보행 및 자세의 이상, 보정에 대한 반응, 강직성 혹은 긴장성 움직임, 습관장애(예를 들어, 과도한 그루밍, 반복적인 회전) 등과 분만의 어려움 혹은 지연, 이상한 행동(예를 들어, 자해, 뒤로 걷기) 등도 자세히 기록한다.
- (4) 각 군에서 무작위로 선택된 수컷 5 마리와 암컷 5 마리에서 청각, 시각 및 고유 감정 자극에 대한 감각 반응성, 악력 및 운동 활성 평가를 수행한다. 수컷에서 이러한 기능 검사는 투여 기간이 끝날 무렵에 치사 직전에 수행하되, 혈액검사와 임상 화학검사를 위한 채혈 전에 실시한다. 암컷의 경우, 예정된 치사 직전 수유 마지막 주(예: LD 6 ~ LD 13) 동안 한 번 실시하는 것이 좋다. 가능한 한 어미와 새끼 분리 시간을 최소화한다.
- (5) 시험이 후속 아만성(90 일) 혹은 장기 시험의 예비 시험으로 수행된다면 시험 막바지에 수행하는 기능 검사가 생략될 수 있다. 이 경우, 기능 검사는 후속 시험에 포함한다.

- (6) 예외적으로, 기능 검사 성능을 현저하게 저해하는 정도로 독성의 징후를 나타내는 시험군에 대해 기능 검사를 생략할 수 있다.
- (7) 수태기간은 임신 0 일부터 계산하여 기록한다. 각각 한배새끼 크기와 성별, 산, 생존출생, 미숙아(대조군 새끼보다 심각하게 작은 새끼) 및 전반적인 이상이 있는지 분만 후 바로 검사한다.
- (8) 생존한 새끼 수를 집계하고 성별을 확인한다. 분만 후 24 시간 내 및 최소한 분만 후 4 일, 13 일에 체중을 측정한다. 새끼들에서 비정상적 행동이 관찰되면 추가적으로 기록한다. 각 새끼의 항문-성기 간 거리(AGD)는 생후 0 일 ~ 4 일 사이의 동일한 시기에 측정하며, 같은 시기에 체중도 측정한다. AGD는 체중의 세제곱근 등 새끼의 크기로 표준화한다. 수컷 유두 및 유륜 수는 대개 생후 12 일 또는 13 일에 계수한다.

3.4. 체중 및 사료/음용수 소비

- (1) 투여 첫날, 종료까지 최소 일주일에 한 번 암컷과 수컷 모두 체중을 측정한다. 암컷의 경우, 수태 기간 중 0 일, 7 일, 14 일, 20 일, 및 분만 후 24 시간 이내(생후 0 일 또는 1 일), 적어도 분만 후 4 일과 13 일에 체중을 측정한다. 체중 측정은 각각의 성체 동물에게서 개별적으로 실시, 기록한다.
- (2) 교배 전(pre-mating), 수태 및 수유 기간 동안 최소한 일주일에 한 번 사료 소비량을 측정한다. 교배 중 사료 소비 측정은 필요시 수행한다. 시험물질이 음용수를 통해 투여되는 경우에는 반드시 음용수 소비량을 측정한다.

3.5. 검사항목

3.5.1. 혈액학적 검사

- (1) 각 시험군에서 무작위로 선발된 5 마리의 수컷과 5 마리의 암컷에서 헤마토크릿, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 망상 적혈구 수, 총 림프구 수, 분화 림프구 수, 혈소판 수, 혈액응고 시간 등의 혈액학적 검사를 수행한다. 시험물질 또는 그 대사산물이 산화력을 가지고 있거나 추정되는 경우, 메트헤모글로빈(methemoglobin) 농도 및 하인즈 소체(Heinz bodies) 측정을 포함해야 한다.
- (2) 암컷들은 채혈 동안에 생리학적으로 비슷한 상태에 있어야 한다. 수태 등 실질적인 어려움을 피하기 위해, 암컷에서의 채혈은 교배 전 기간의 막바지에 채혈 대신 안락사의 직전 혹은 일환으로 수행될 수 있다. 수컷의 혈액은 동물 안락사

직전 또는 일환으로 채취하는 것이 바람직하다. 또는, 교배 전 기간의 막바지에 채혈하는 것이 암컷에게서 선호된다면 수컷에서의 채혈도 같은 시기에 수행한다.

3.5.2. 생화학적 검사

- (1) 조직과 신장, 간에서 중요 독성 효과를 확인하기 위한 임상 생화학적 검사는 각 시험군에서 얻어진 5 마리의 암컷과 5 마리의 수컷에서 채취된 혈액으로 수행한다. 채혈 전날 밤 절식이 권장된다. 혈장과 혈청의 관찰 항목에는 나트륨, 칼륨, 포도당, 총 콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총 단백질과 알부민, 간세포 기능을 나타내는 최소 2 가지 효소(예를 들어, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파테이트 아미노기 전이효소, 소르비톨 탈수소 효소)와 담즙산을 포함해야 한다. 추가적으로 간 혹은 기타 장기 기원의 효소와 빌리루빈의 측정을 통해 특정 상황에서 유용한 정보를 제공할 수 있다.
- (2) 아래와 같은 일정으로 채혈하고, 모든 혈액 샘플은 적절한 환경에 보관한다.
 - 출생 후 4 일째 한배 당 최소 2 마리 새끼에서 채혈
 - 출생 후 13 일째 종료지점에 모든 어미 그리고 한배 당 최소 2 마리 새끼에서 채혈
 - 시험 종료 시 모든 성체 수컷에서 채혈13 일째 새끼 및 성체 수컷의 혈액에서는 혈청 갑상선 호르몬(T4)을 측정한다. 필요하다면 어미와 4 일째 새끼의 혈액에서 추가적인 T4 검사를 한다. 필요하다면 다른 호르몬 검사도 수행한다. 새끼 혈액은 출생한 어미별로 갑상선 검사를 위해 합쳐지기도 한다. 갑상선 호르몬류(T4와 TSH)는 한꺼번에 측정되는 것이 바람직하다.
- (3) 선택적으로, 각 시험군에서 무작위로 선택된 5 마리의 수컷에서 시험 마지막 주 동안 시간별로 수집된 소변(timed urine volume collection)을 사용하여 육안 관찰, 부피, 삼투압 혹은 비중, pH, 단백질, 포도당, 혈액, 혈구 등의 검사를 수행한다.
- (4) 추가적으로, 일반적 조직 손상의 혈청 표지자 시험을 고려한다. 시험물질 특성상 관련 대사 프로파일에 영향을 미칠 수 있는 가능성이 있다면, 칼슘, 인산, 공복 트리글리세라이드, 공복 혈당, 특정 호르몬, 메트헤모글로빈 그리고 콜린 에스터라제 등의 검사를 추가적으로 수행한다.

- (5) 호르몬 측정을 위한 혈장 샘플은 비슷한 시간대에 확보한다. 호르몬 농도를 분석 할 때 얻은 수치는 다양한 분석 키트에 따라 다르다. 안락사 시간, 방식, 키트 종류에 따라 호르몬 측정의 가변성과 절대 농도에 영향을 줄 수 있다.

3.5.3. 병리학적 검사

3.5.3.1. 일반 부검

- (1) 시험에 사용된 모든 성체 동물들에서 체표면, 모든 체구(orifices), 두개골, 흉강, 복강과 그 내용물의 검사를 포함하여 자세한 부검을 실시한다. 생식계 기관은 보다 주의하여 부검한다. 착상 위치(implantation sites)의 수를 기록한다. 부검 시 질 도말 검사를 통해 성 주기의 단계를 확인하고 암컷 생식 기관의 조직 병리학과 상관성을 분석한다.
- (2) 모든 수컷 성체 동물의 고환과 부고환 뿐 아니라 전립선과 응고선을 포함한 정낭선의 중량을 측정한다. 주변의 조직을 최대한 제거하고, 건조를 방지하기 위해 가능한 한 즉시 습중량을 확인한다. 수컷에서의 요도망울샘, 음경귀두 및 암컷에서의 난소 및 자궁(경부 포함) 등의 무게를 측정한다. 가능한 한 조직 분리 즉시 무게를 측정한다. 난소, 고환, 부고환, 부속 성기 및 부검 시 소견이 관찰된 모든 장기는 보존한다.
- (3) 조직 병리학적 검사를 위해 모든 성체 수컷과 암컷 그리고 각 배에서 나온 13 일째 수컷과 암컷 새끼 한 마리의 갑상선을 적절한 고정 배지에 보관한다. 고정(fixation) 이후 갑상선 무게를 측정한다.
- (4) 추가적으로, 각 시험군에서 무작위로 선택된 암수 모동물 최소 5 마리(시험 종료 전에 사망하거나 치사된 경우와는 별도)에서 간, 신장, 부신, 비장, 뇌, 심장은 주변 조직을 제거하고 건조를 막기 위해 가능한 한 즉시 습중량을 확인한다. 다음의 조직들을 고정하여 조직 검사에 이용한다; 심각한 모든 병변, 뇌(대뇌, 소뇌 및 뇌교를 포함한 대표적인 부분), 척수, 눈, 위장, 소/대장(파이어반 포함), 간, 신장, 부신, 비장, 심장, 갑상선, 기관지, 폐, 생식선(고환과 난소), 부속 성기관(자궁 및 자궁 경부, 부고환, 전립선, 정낭 및 응고선), 질, 방광, 림프절(가장 가까운 근위 배수절 외에 다른 림프절은 해당 실험실의 경험에 따라 검사해야 함), 말초 신경(좌골 또는 경골), 골격근, 골수와 뼈.
- (5) 생식선(난소 및 고환), 부속 성 기관(자궁, 자궁 경부, 부고환, 정낭, 응고선, 등과 배쪽의 전립선), 질, 뇌하수체, 수컷 유선과 부신선 등의 조직은 내분비 관련

영향에 대한 중요한 지표를 제공할 수 있다. 충분히 증명되지 않았지만, 수컷 유선에서의 변화는 에스트로겐 작용을 가진 물질에 매우 민감할 수 있다. 위에 열거되지 않은 기관이나 조직의 관찰은 선택 사항이다.

- (6) 죽은 새끼와 분만 후 13 일째 혹은 그 직후에 치사된 새끼는 전반적인 이상이 있는지 외형을 정밀하게 검사한다. 발달 변화의 징후를 검사하기 위해 외부 생식기에 더 특별한 주의를 기울여야 한다.

3.5.3.2. 조직 병리학적 검사

- (1) 대조군과 고용량 시험군에서 선택된 동물의 장기 및 조직에서 전체 조직 병리학적 검사를 수행한다. 이 때, 수컷 생식선에서 정자 생성 단계 그리고 고환 간질 세포의 조직 병리에 중점을 두어 관찰한다. 필요하다면, 새끼와 남은 성체 동물에서의 갑상선을 검사한다. 고용량 시험군에서 투여와 관련된 변화가 관찰되는 경우, 이 검사는 다른 시험군의 동물로 확대한다.
- (2) 모든 전반적인 병변을 확인한다. 무영향관찰용량(NOAEL)을 규명하기 위해, 다른 용량 시험군의 표적 기관을 검사할 필요가 있다.
- (3) 위성 시험군을 사용하는 경우, 투여군에서 시험물질의 영향이 확인된 조직 및 기관에 대해 조직 병리학적 검사를 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과

1.1. 시험결과의 처리

- (1) 개별 결과가 제공되어야 하며, 데이터는 각 시험군 별로 다음의 항목을 표 형태로 요약한다. 각 시험군에 대해 시험 시작 시 동물 수, 시험 중 죽은 채 발견되거나 안락사 시킨 동물 수, 사망 또는 안락사 시간, 가임 동물의 수, 수태한 암컷 수, 독성 징후가 있는 동물의 수, 발병 시간, 지속 기간, 독성 영향의 심각성을 포함한 관찰된 독성 징후에 대한 기술, 조직 병리학적 변화 유형 및 한배 새끼의 모든 관련 시험자료를 포함하여 정리한다. 생식/발달 영향의 평가에 매우 유용한 것으로 입증된 표 요약 보고서 형식은 부록 2에 제시되어 있다.
- (2) 수치 결과는 적절하고 일반적으로 적용되는 통계적 방법으로 평가한다. 한배 새끼가 결과 분석의 단위가 된다. 통계 분석을 하는 경우, 변수의 분포에 적합한 통계 분석법을 사전에 선택하여 사용한다.

1.2. 시험결과의 평가

- (1) 이 독성 시험 결과는 관찰된 영향, 부검 및 현미경 소견을 기반으로 평가한다. 심각한 병변을 포함한 장애의 발생빈도와 심각성, 확인된 표적기관(identified target organs), 불임성, 임상적 이상, 생식 영향과 새끼의 행동 변화, 체중 변화, 사망률 영향 및 다른 독성 영향들과 투여된 시험물질 용량과의 상관관계를 분석한다.
- (2) 수컷의 투여 기간이 짧기 때문에 수컷 생식 효과를 평가할 때 번식능 자료와 함께 고환과 부고환의 조직 병리 결과를 참고한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험물질

2.1.1. 물질데이터(출처, 순도, 로트 번호 등)

2.1.2. 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도 등)

2.1.3. 단일성분물질의 경우 다음 자료

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 그 외의 확보 가능한 물질정보
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 관련 물리·화학적 성질
- (3) 순도, 불순물의 확인

2.1.4. 다성분으로 이루어진 물질, UVCB(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials)와 혼합물의 경우 다음 자료

- (1) 위에서 언급한 물질의 화학적 특성
- (2) 구성성분의 정량적 구성 및 관련 물리화학적 성질

2.2. 용매

물 이외의 용매를 사용한 경우, 논리적 근거

2.3. 실험동물

2.3.1. 동물의 종/계통

- 2.3.2. 동물의 수, 주령, 성별
- 2.3.3. 구매처, 사육환경, 사료 등
- 2.3.4. 동물의 체중 범위, 군별 평균 및 표준편차, 시험시작 및 종료 시의 동물의 개별 중량
- 2.3.5. 랫드가 아닌 경우, 사용한 종에 대한 타당성

2.4. 시험조건

- 2.4.1. 투여용량선정에 대한 이론적 근거
- 2.4.2. 시험물질 제형/사료 조제내용, 최종농도, 안정성과 균질성 정보
- 2.4.3. 시험물질의 투여 내용에 대한 세부사항
- 2.4.4. 실제 투여량(mg/kg/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- 2.4.5. 도태 과정이 일어났다면, 도태될 새끼를 고르기 위한 무작위 과정

2.5. 결과

- 2.5.1. 체중/체중 변화
- 2.5.2. 사료와 음용수 소비
- 2.5.3. 성별과 투여량에 따른 번식능, 수태 다른 독성 징후를 포함한 독성 영향
- 2.5.4. 수태기간
- 2.5.5. 번식, 착상자, 출생 후 성장 등에 대한 독성 영향
- 2.5.6. 임상 관찰의 특성, 심각성 및 지속 기간(가역 여부)
- 2.5.7. 감각 활동, 악력 및 운동 활동 평가
- 2.5.8. 혈액학적/생화학적 검사와 기준치
- 2.5.9. 정상 또는 이상 성 주기 및 주기 지속 기간을 갖는 성체 암컷의 수
- 2.5.10. 출생 수 및 착상 후 손실
- 2.5.11. 전반적으로 육안 이상을 나타내는 새끼들 수; 외부 생식기 전반적 평가, 미숙아 수
- 2.5.12. 시험 기간 동안의 사망 시간 또는 종결까지 동물의 생존 여부
- 2.5.13. 착상의 수, 기록 당시 한배새끼 크기와 체중
- 2.5.14. 새끼 체중 자료
- 2.5.15. 모든 새끼의 AGD (및 AGD 측정시 체중)

2.5.16. 수컷 새끼들에서 유두 잔류

2.5.17. 13 일째 새끼와 성체 수컷에서의 갑상선 호르몬 수치(추가적으로 측정되었다면, 4 일째 새끼와 어미에서의 갑상선 호르몬 수치)

2.5.18. 안락사 시 부모 동물의 체중과 장기 무게 자료

2.5.19. 부검자료

2.5.20. 병리 소견의 상세한 설명

2.5.21. 흡수 자료 (가능하다면)

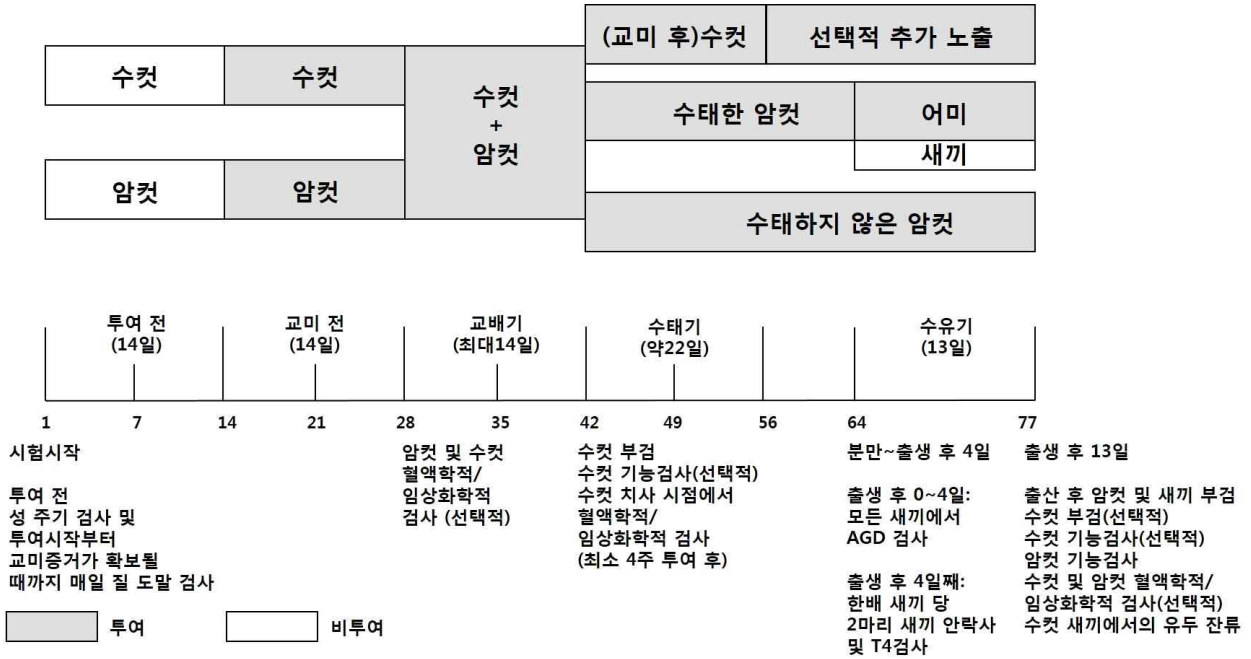
2.5.22. 적절한 경우 결과의 통계 처리

2.6. 고찰

2.7. 결론

부록 1

총 14 일의 교배 기간을 기반으로 한 최대 시험 기간을 나타내는 시험 계획의 도식



부록 2

생식/발달에 관한 결과 요약 보고서

관찰	값				
투여용량(단위)	0(대조군)
교배 시작 시 암컷/수컷 수(N)					
성 주기(최소한 평균 주기와 불규칙한 주기의 빈도)					
교미의 증거가 있는 암컷의 수(N)					
수태한 암컷의 수(N)					
수태 1-5 암컷의 수(N)					
수태 6 - . . . 암컷의 수(N)					
수태 ≤ 21 일 암컷의 수(N)					
수태 = 22 일 암컷의 수(N)					
수태 ≥ 23 일 암컷의 수(N)					
생존 새끼를 분만한 암컷의 수(N)					
출산 후 4 일째 생존해 있는 새끼를 분만한 암컷의 수(N)					
착상 수/어미(평균)					
출생 시 생존한 새끼/어미(평균)					
출생 후 4 일째 생존한 새끼/어미(평균)					
출생 시 성비(암/수)(평균)					
출생 후 4 일째 성비(암/수)(평균)					
출생 시 한배새끼(litter) 무게(평균)					
출생 후 4 일째 한배새끼(litter) 무게(평균)					
출생 시 새끼(pup) 무게(평균)					
AGD 측정시의 체중(평균 수컷, 평균 암컷)					
같은 출생일 후에 측정, 출생 후 4일째 새끼 AGD (평균 수컷, 평균 암컷, PND 참고)					
출생 후 4 일째 새끼(pup) 무게(평균)					
출생 후 13 일째 새끼(pup) 무게(평균)					
출생 후 13 일째 수컷 새끼 유두 잔류(평균)					
비정상 새끼					
비정상이 0 마리인 어미					
비정상이 1 마리인 어미					
비정상이 2 마리 이상인 어미					
죽은 차산자					
분만-전(수정에서 생존하여 태어난 경우를 뺀 것)					
0 마리인 암컷					
1 마리인 암컷					
2 마리인 암컷					
3 마리 이상인 암컷					
출생 후(출생 후 13 일 생존)					
0 마리인 암컷					
1 마리인 암컷					
2 마리인 암컷					
3 마리 이상인 암컷					

제42항 발달신경독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 모동물에 시험물질을 투여한 후 신생자의 신경계 발달에 대한 기능적 및 형태학적 영향을 평가함으로써 발달신경독성 가능성을 확인하는데 목적이 있다.

II. 시험

1. 원리

임신과 수유 중에 시험물질을 모동물에 투여한 후 모동물에 대해서는 임신 및 수유에 미치는 독성학적 영향을 평가하며, 모동물로부터 출생한 신생자에 대해서는 신체발달, 행동발달, 운동능력, 운동 및 감각기능, 학습 및 기억능력 등에 관한 신경학적 및 행동학적 비정상 상태를 관찰하고 아울러 출산 후 발달기간 및 성숙기 동안의 신경 병리와 뇌의 중량에 관한 사항을 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

- (1) 본 시험방법은 랫드를 사용하는 것이 가장 좋다. 다른 종을 사용할 경우에는 독성학적, 약동학적 및/또는 기타 자료에 근거하여 적절한 논리적 근거를 제시한다. 만약 랫드 외 다른 종을 사용하였다면 발달신경독성에 대한 신뢰성과 민감성을 확인할 수 있는 자료가 있어야 한다.

2.2 사육조건

- (1) 사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 50 % ~ 60 %가 되도록 유지하고 조명은 인공적으로 조절하며 명암주기를 12 시간 간격으로 설정한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.
- (2) 동물은 개별적으로 케이지에 유지하거나 같은 성별로 소규모 그룹으로 케이지에 사육한다. 교배가 이루어진 동물은 분만 또는 포육이 가능한 케이지에 사육

하여야 하며, 분만이 가까워지면 품질이 확인된 적절한 깔짚으로 새끼둥지를 만들 수 있도록 하여준다.

(3) 모동물을 잘못 다루거나 임신 중 스트레스를 주면 태자사망, 태자기 및 출생 후의 태자발달장애 등의 이상을 초래할 수 있으므로, 임신 중인 동물은 조심스럽게 다루어야 하며 소음과 같은 외부 요인으로부터 스트레스를 받지 않도록 한다.

(4) 케이지의 배치로 인해 동물이 영향을 받지 않도록 적절히 배치한다.

2.3 동물의 준비

(1) 이전에 다른 시험에 사용된 적이 없는 건강한 동물을 실험 전에 순화시킨 후 사용하여야 한다.

(2) 실험동물은 종, 계통, 공급처, 성별, 체중 및 나이(주령) 등이 확인하며 각 동물에 대해서는 고유의 식별 번호를 부여하고 표식을 하여야 한다.

(3) 모든 시험군의 동물은 가능한 한 무게와 나이가 일정하고 시험 중인 종 및 계통의 정상 체중범위 내에 있는 것으로 한다.

3. 시험방법

3.1 동물의 수와 성별

(1) 각 시험군과 대조군은 신경독성 평가에 필요한 충분한 수의 차세대동물이 출산될 수 있도록 충분한 수의 임신 중인 암컷을 배정하여야 한다. 각 용량 마다 시험에 사용할 총 한배새끼(litter) 수는 20이 되도록 한다.

(2) 출생 후 4 일 (PND 4) 또는 그 전에, 시험에 필요하지 않는 여분의 출생자(pup)를 무작위 추출방법으로 시험에서 제외시킴으로써 시험에 사용할 모든 출생자 수를 각 모동물별로 동일하게 조절한다.

(3) 각 모동물에서 태어난 출생자는 가능하면 암·수 출생자수가 거의 동일하도록 구성한다.

3.2 차세대동물의 평가에 대한 동물배정

(1) 각 군별 각각의 한배새끼에서 모든 검사항목이 동일하게 대표성을 갖도록 암수 각각의 출생자를 선택하여야 한다.

(2) 운동활동검사는 이유 전 한배새끼에 해당하는 암수 한 쌍에 대해 검사하여야

한다. 다른 모든 검사의 경우, 한배새끼가 아닌 암수 한 쌍으로 배정하여 시험할 수도 있다. 인지능력 검사를 진행하는데 있어서 나이 및 사전 훈련의 효과를 피하기 위해, 이유시기의 인지능력 검사시험과 성숙동물의 인지능력 검사시험에서 다른 출생자를 배정할 필요가 있다. 각각의 출생자가 아닌 한배새끼 또는 모동물 단위로 통계 처리하여야 한다.

(3) 차세대동물의 시험에 필요한 동물의 배정방법은 부록1에 제시되어 있다.

3.3 투여용법

- (1) 최소한 3 용량의 투여군과 별도의 대조군을 두어야 하며 이때 용량범위는 독성 영향이 등급별로 나타날 수 있도록 적절한 간격을 두어야 한다. 시험물질 또는 용매는 체중기준으로 동일한 액량을 투여한다.
- (2) 시험물질의 물리화학적 성질이나 생물학적 특성에 의해 제한이 되지 않는 한, 최고용량은 어느 정도 모체독성(예: 임상 징후, 체중 증감 10 % 이하) 및/또는 표적장기에서 독성의 증거가 나타나는 용량으로 선정한다. 고용량은 예외는 있으나, 1000 mg/kg/day 으로 제한 할 수 있다.
- (3) 최저용량은 신경독성을 포함하여 모동물 독성 또는 출생자 발달독성을 나타내지 않을 용량을 선정하도록 한다. 저용량 범위를 설정할 때는 용량-반응, 무영향관찰용량(NOAEL) 또는 기준용량(BMD)을 결정할 수 있는 용량으로 설정한다.

3.4 시험물질 각 용량의 투여

- (1) 시험물질은 인체노출 경로와 가장 관련성이 높을 것으로 보이는 경로를 선택하여 투여한다. 각 모동물에게 투여되는 용량은 개별 체중 값에 근거하여 설정해야 한다.
- (2) 시험물질은 착상(GD 6)부터 수유기간(PND 21) 동안에 모동물에 대해 매일 투여함으로써, 차세대동물(F1)이 태아 및 수유기 동안의 신경발달 기간에도 지속적으로 시험물질에 노출되도록 한다. 랫드 외 다른 종을 사용할 경우, 투여기간은 뇌 발달 초기단계의 전 기간(사람의 태아 및 초기신생아의 뇌성장 기간에 해당하는)에 시험물질이 노출될 수 있도록 랫드의 투여기간과는 다른 기간으로 조정할 수 있다.
- (3) 일반적으로, 출생자의 시험물질 노출은 모동물의 모유를 통해 일어나는 것으로 가정한다. 하지만, 만약 모유를 통한 연속적인 노출이 이루어지지 않는 경우에

는 출생자에 대한 직접적인 투여를 고려해야 한다.

3.5 관찰

3.5.1 모동물에 대한 관찰

- (1) 모든 모동물에 대해서는 질병 및 사망 여부를 포함한 건강상태에 대해 매일 적어도 1 회 이상 주의 깊게 관찰하여야 한다.
- (2) 투여기간과 관찰기간 동안, 투여군당 최소 10 마리의 모동물에 대해 보다 상세한 임상 관찰을 주기적으로(임신 기간 동안 최소 2 번, 수유 기간 동안 2 번) 실시해야 한다.
- (3) 임상관찰은 피부, 가죽, 눈, 점막, 분비물의 발생 및 자율 신경계 활동(예: 유루 증, 털세움, 동공 크기, 비정상적인 호흡 패턴 및/또는 구강 호흡, 배뇨이상 또는 배변이상의 징후) 등을 포함하며, 이들만으로 국한시켜 관찰하기 보다는 가능한 넓은 범위에서 관찰하도록 한다.
- (4) 신체위치, 활동수준(예: 정해진 구역에서의 움직임 증가 또는 감소) 및 운동조화능력 등에 대한 비정상적인 반응도 기록해야한다. 간대성 또는 긴장성 움직임, 경련, 진전, 반복움직임(예: 과도하게 털을 핥는 행위, 비정상적인 머리 움직임, 반복적인 회전운동 등), 기괴한 행동(예: 물어뜯거나 과도한 핥기, 자기 절단, 뒤로 걷기, 발성) 또는 공격성뿐만 아니라 보행의 변화(예: 걷는 것을 매우 힘들어 함, 운동 실조 등)도 관찰하고 기록한다.
- (5) 독성증상에 대해서도 발병 날짜, 시간, 정도 및 기간을 포함하여 모두 기록한다.
- (6) 동물의 체중은 전체 시험기간 중 투여기간에는 최소 1 주일에 1 회, 그리고 출산 당일 또는 전후, 그리고 PND 21(수유날)에 측정한다. 시험물질이 음용수를 통해 투여될 경우에는 음용수 소비량은 최소 매주 1 회 측정한다.

3.5.2 차세대동물에 대한 관찰

- (1) 모든 차세대동물들은 독성의 징후와 질병 및 사망에 대해 적어도 매일 신중하게 관찰한다.
- (2) 투여 및 관찰기간 동안, 새끼들에 대한 보다 상세한 임상관찰이 실시한다.
- (3) 독성증상에 대해서도 발병 날짜, 시간, 정도 및 기간을 포함하여 기록한다.

3.5.2.1 신체 및 발달의 지표

- (1) 이유 전 발달지표(예: 이개, 개안, 치아맹출)의 변화는 체중과 밀접한 관련이 있다. 체중은 신체 발달의 가장 좋은 지표라 할 수 있다.
- (2) 살아 있는 차세대동물의 수를 측정하고, 육안검사나 항문-생식기관의 거리 등으로 성별을 구분하며, 한배새끼는 각각 출생 직후 또는 적어도 수유 기간 동안에는 매주 체중을 측정하여야 한다. 성의 성숙정도를 평가할 때는, 한배새끼 당 최소 암컷 한 마리와 수컷 한 마리에서 질 개구 또는 음경포피분리가 발생한 나이(주령)와 체중을 측정한다.

3.5.2.2 초기행동발달

한배새끼 당 성별로 최소 1 마리(one pup/sex/litter)에 대해서 선택한 행동발달 검사항목을 적절한 측정나이에 맞게 해당하는 기간 동안에 검사한다. 그리고 시험기간 동안 모든 행동발달 검사는 동일한 동물에 대해 실시한다.

3.5.2.3. 자발운동량

- (1) 자발운동량은 이유-전 그리고 성숙 후에 측정한다. 운동능력은 운동능력의 증감을 측정할 수 있는 기기에 의해 자동 모니터링 방법으로 측정한다.
- (2) 각 동물은 개별적으로 검사하며, 투여군의 주야주기(circadian rhythms)에 따른 활동 값의 혼란을 피하기 위해 측정시간마다 상호 대조-군형을 맞춘다. 시험조건의 변이/변수가 최소로 나타나고 시험조건의 변이에 의해 시험물질투여에 체계적인 관련성을 발생시키지 않아야 한다.

3.5.2.4. 운동기능 및 감각기능

- (1) 성장기(adolescent period)에는 적어도 1 회, 약령성숙기(young adult period)(예: PND 60 ~ PND 70)에는 1 회의 운동 및 감각기능 측정을 수행한다.
- (2) 운동 및 감각 기능에 대한 시험의 몇 가지 예는 신전추력반응, 정향반사, 청각반응, 그리고 유발전위 등을 들 수 있다.

3.5.2.5. 학습 및 기억능 검사

- (1) 학습과 기억능 검사는 이유-후(예: 25 일 \pm 2 일) 시점과 약령성숙기(PND 60 및 그 이후) 시점에 시행하며, 두 시점의 발달단계에서 동일한 검사 또는 다른 별도의 검사를 시행할 수 있다.

(2) 검사방법은 아래 두 가지 기준을 만족하여야 한다.

- 첫째, 학습은 여러 번 반복되는 학습의 시도 또는 단회의 학습의 시도를 통해 얼마나 변화되었는지의 정도로 평가 한다. 이때 교육경험과 관련되는 영향을 배제할 수 있는 표준조건이 설정한다.
- 둘째, 기존의 학습(사전지식)에 더하여, 단기간 또는 장기간의 기억을 측정한다. 동일한 검사로부터 얻어진 사전지식이 측정되지 않은 상태에서 수행한 기억능의 측정은 시험결과로 적절하지 않다.

3.5.3 부검

- (1) 모동물은 차세대동물들에 대한 이유가 끝난 후 부검시킬 수 있다.
- (2) 차세대동물들에 대한 신경병리학적 평가는 시험종료 시 뿐만 아니라, 생후 22 일 또는 생후 11 일 ~ 22 일 사이의 초기 시점에 실시된다. 생후 22 일에 치사시킨 차세대동물들에 대해서 뇌 조직을 검사하며 이때 중추신경계(CNS) 조직과 말초신경계(PNS) 조직 모두를 평가한다.
- (3) 치사시킨 차세대동물들의 조직은 고정액에 담그거나(침적, immersion) 또는 관류(灌流, perfusion)시키는 방식으로 고정시킨다. 시험종료 시 치사시킨 동물의 조직은 관류방식으로 고정시킨다. 조직샘플의 모든 제작과정은 각 투여군의 대표적인 조직샘플의 절편이 검정될 수 있도록 실험 계획을 사전에 마련한다.

3.5.4 조직표본제작

- (1) 부검 시에는 육안으로 관찰된 모든 비정상 소견을 기록한다. 조직표본은 신경계의 모든 주요 부위를 대표할 수 있는 부위에서 취한다.
- (2) 조직표본은 적절한 고정액에 유지시켜 보관하며, 표준화된 조직병리학적 시험법에 따라 처리한다.

3.5.5 신경병리학 검사

- (1) 정성검사는 아래 사항을 목적으로 실시한다.
 - 신경 병리학적 변화의 증거를 나타내는 신경계 내의 영역을 확인
 - 시험물질에 노출되어 생기는 신경병리학적 변화 유형을 확인
 - 신경병리학적 변화의 중증도의 등급을 결정

- (2) 형태학적 검사(정량)는 반드시 수행하며, 뇌의 특정 영역에 대한 길이와 면적에 대한 측정 등을 포함한다. 특정 신경해부학적 영역의 부피 또는 세포 수와 같은 지표에 대한 시험물질의 영향을 확인하기 위해 입체학적 기법을 사용할 수 있다.
- (3) 뇌의 주요 영역[예: 후각 구근, 대뇌 피질, 해마, 기저핵, 시상, 시상하부, 중뇌(중뇌개, 피개 및 대뇌각, 뇌교, 연수, 소뇌)]의 모든 부위로부터 표본을 만들도록 하며, 모든 동물의 표본조직 부위는 같은 면상에서 절편으로 취한다. 또 척수 및 말초 신경의 표본절편은 교차 또는 가로 및 세로 절편부위가 모두 포함하도록 한다.
- (4) 신경병리학적 평가에는 세포변성(예: 신경세포 공포증, 퇴행, 괴사) 및 조직변성(신경아교증, 백혈구 침윤, 포낭 형성) 관찰뿐만 아니라, 신경 계통의 발달손상 징후에 대한 검사를 포함한다.
- (5) 고용량군의 조직절편을 대조군의 조직절편과 비교한다. 신경병리학적 변화의 증거가 고용량군에서 발견되면 중간용량군 및 저용량군의 동물을 검사한다. 사망 또는 그 외 다른 사유로 고용량군의 시험이 종료되는 경우, 그 다음 아래 용량군에서 신경병리학적 병변을 분석한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 평가 및 해석

- (1) 동물, 시험설계, 통계 분석 및 데이터의 생물학적 중요성 간의 복잡한 상관관계 때문에 발달신경독성 시험결과의 적절한 해석에는 전문가의 판단이 필요하며, 시험 물질의 투여용량과 각 암수 성별로 발현되는 신경독성영향의 존재유무, 발생률, 정도 등에 대한 상관성을 판단한다.
- (2) 시험자료의 평가에는 생물학적 및 통계적 유의성에 대한 토론 내용을 포함한다. 통계분석은 데이터의 해석을 결정하기보다 해석의 지침을 제시하는 수단으로 간주되어야 하며 모든 결과는 실험설계에 적합한 통계 모델을 사용하여 분석한다.

2. 시험자료 및 보고

2.1 시험보고서

시험보고서에는 다음 정보를 포함한다.

2.1.1 시험 물질

- (1) 물리적 성질 및 물리화학적 성질
- (2) 출처를 포함한 식별 데이터
- (3) 제제의 순도 및 불순물

2.1.2 용매(해당되는 경우)

- (1) 용매선택에 대한 논리적 근거

2.1.3 시험동물

- (1) 사용된 종 및 계통, 랫드를 사용하지 않은 경우 논리적 근거
- (2) 시험동물의 공급자
- (3) 동물의 수, 시작 시의 주령, 성별
- (4) 구입처, 사육조건, 사료, 음용수 등
- (5) 시험 시작 시 개체별 체중

2.1.4 시험조건

- (1) 용량 선정에 대한 이론적 근거
- (2) 투여경로 및 기간에 대한 이론적 근거
- (3) 투여 용매/시험물질의 물리적 형태/부피 등을 포함하여 투여용량에 관한 세부사항
- (4) 시험물질제제 및 사료의 준비, 최종농도, 안정성 및 제제의 균질성 등에 관한 세부사항
- (5) 모동물과 차세대 동물의 고유 표식에 사용되는 방법
- (6) 투여군의 어미 할당방식, 도태를 위한 새끼의 선정방식, 시험에 할당될 차세대동물에 대한 선정방식 등 무작위 선정과정에 대한 상세한 설명
- (7) 시험물질 투여에 관한 세부사항
- (8) 해당되는 경우 사료/음용수 또는 흡입시험물질의 농도(ppm)에서 실제 노출용량(mg/kg/day)으로의 변환
- (9) 환경 조건
- (10) 사료 및 음용수의 품질(예: 수돗물, 증류수)
- (11) 시험 개시일과 종료일

2.1.5 관찰 및 시험절차

- (1) 관찰결과를 점수화 하는데 대한 절차뿐만 아니라 관찰과 진행을 표준화시키는데 사용한 절차의 상세한 설명
- (2) 모든 시험절차 목록 및 논리적 근거
- (3) 병리학적, 신경화학적 또는 전기생리학적 절차의 세부 사항(자동화 된 장치에 대한 정보 및 세부 정보 포함)
- (4) 시험과정에 있어서, 투여군 및 장치의 동등성 및 균형을 보장하고 교정하기 위한 절차
- (5) 전문적 판단을 포함한 모든 결정에 대한 간단한 설명

2.1.6 결과(평균 및 분산을 포함한 개별결과 및 요약결과)

- (1) 시험개시 및 종료 시의 동물의 수
- (2) 각 시험에 사용 된 동물 및 한배새끼의 수
- (3) 각 동물 및 그로부터 출산된 차세대동물의 식별 번호
- (4) 출생자 및 각 성별로 출생 시의 평균 체중
- (5) 체중 및 체중 변화 데이터(모동물 및 차세대동물에 대한 시험 종료 시의 체중 포함)
- (6) 사료섭취량 및 음용수 섭취량(예: 시험물질이 물을 통해 투여되는 경우)
- (7) 성별/투여용량별 독성반응자료(독성징후, 사망률, 사망 시간 포함)
- (8) 성격, 중증도, 기간, 발병일, 시간 및 자세한 임상 관찰의 후속 진행경과
- (9) 각 관찰시간에서의 각 발달지표(체중, 성숙 및 행동 개체 발생)에 대한 점수
- (10) 성별로 각 시험동물의 기능적, 신경병리학적, 신경화학적, 전기생리학적 관찰결과에 대한 상세한 설명(대조군에 비하여 증가 또는 감소 등)
- (11) 부검 소견
- (12) 두뇌 무게
- (13) 자연적으로 발생한 질병 및 상태를 포함한, 신경학적 징후 및 병변에 대한 모든 진단 결과
- (14) 표본 소견의 이미지
- (15) 형태 분석에 사용된 조직절편의 상동성을 평가하기 위한 저해상 이미지
- (16) 별도의 독성동태 시험에서 얻은 보완 데이터를 포함한 흡수 및 대사 데이터(가능한 경우)

- (17) 시험결과의 통계처리; 통계적 의미의 유/무와 무관하며 분석에 사용된 통계모델, 결과 값을 포함하도록 함
- (18) 전문인력을 포함한 시험에 참여한 담당자의 명단

2.1.7 결과 토론

- (1) 성별 및 군별 용량-반응에 관한 정보
- (2) 성별 및 군별로, 시험물질의 신경독성 가능성에 대한 결론과 이와 다르게 나타나는 독성영향의 상관성
- (3) 결론에 대한 독성동태정보의 영향력
- (4) 알려진 신경독성물질에서 나타나는 영향과의 유사성
- (5) 시험 방법의 신뢰성 및 민감성에 관한 자료(즉, 양성 및 과거대조군 자료)
- (6) 신경 병리학적 및 기능적 영향과의 상관관계(있는 경우)
- (7) 성별 및 군별로, 무영향관찰용량(NOAEL) 또는 모동물 및 출생자에 대한 기준용량(기준용량)

2.1.8 결론

- (1) 시험물질이 발달신경독성을 유발하는지에 대한 여부 및 무영향관찰용량을 포함하여 결과에 근거한 시험자료의 전반적인 해석에 대한 논의

부록 1

1. 아래 표는 실험동물의 배정에 대한 사례를 정리한 것이다. 이 사례는 시험목적에 따라 다양한 방식으로 동물을 배정할 수 있다는 것을 보여주기 위한 것이다.

사례 1

2. 초기행동발달에 대한 이유 전 시험에 한 세트 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)을 사용한다. 이들 동물 중 생후 22 일에 10 마리씩을 인도적으로 치사시켜 뇌를 채취한 후 무게를 측정하고, 조직병리학적 평가를 위한 포르말린 고정 과정 등 차후 시험과정을 진행한다. 나머지 동물에 대해서는 뇌를 채취한 후 무게를 측정한다.
3. 또 다른 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 암수 각각 20 마리씩으로 구성)은 이유후의 기능/행동검사(자세한 임상 관찰, 운동 활동, 청각반응 및 인지기능) 및 성적 성숙도 평가를 위해 사용한다. 이 가운데, 10 마리씩에 대해서는 시험종료 시(대략 생후 70 일) 마취시킨 후 관류방식으로 고정시킨다. *In situ* 방법으로 추가 고정 후, 뇌를 채취하여 신경병리학적 평가를 위한 차후 시험과정을 진행한다.
4. 약령성숙동물(예를 들어, 생후 60 일 ~ 70 일)에 대한 인지능력 평가를 위해서는, 세 번째 세트, 즉 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)을 사용한다. 이 가운데 10 마리의 차세대동물은 시험종료 시에 인도적으로 치사시키고 뇌를 채취하여 중량을 측정한다.
5. 나머지 20 마리의 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)에 대해서는 가능한 추가 검사를 위해 남겨둔다.

표 1

출생자수 ^a 수컷/암컷		배정된 출생자수	검사/시험
1	5	20 수 + 20 암 10 수 + 10 암 10 수 + 10 암	초기행동발달 생후 22 일 뇌중량/신경병리학/형태계측 생후 22 일 뇌중량
2	6	20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	상세한 임상 관찰 자발운동량 성숙속 운동 및 감각 기능 학습 및 기억(생후 25 일) 성체 뇌중량/신경병리학/형태계측:생후 70 일
3	7	20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	학습 및 기억(성숙동물) 성숙동물의 뇌중량 ~ 생후 70 일
4	8		대체시험 또는 추가시험을 위해 동물 보관

a) 이 사례에서는, 한배새끼는 4 마리의 수컷과 4 마리의 암컷으로 추려진다. 수컷 출생자는 1에서 4까지, 암컷 출생자는 5에서 8까지 번호를 매긴다.

사례 2

6. 초기행동발달에 대한 이유 전 시험에 한 세트 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)을 사용한다. 이들 동물 중 생후 11 일에 10 마리를 인도적으로 치사시키고 뇌를 채취한 후 중량을 측정한다. 조직병리학적 평가를 위한 차후 과정을 진행한다.
7. 또 다른 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)에 대해서는 이유후의 기능/행동검사(자세한 임상 관찰, 운동활성, 성적성숙도/운동기능/감각기능의 나이) 평가를 위해 사용한다. 이 가운데, 10 마리에 대해서는 시험 종료 시(대략 생후 70 일) 마취시킨 후 관류방식으로 고정시킨다. *In situ* 방법으로 추가 고정 후, 뇌를 채취해 신경병리학적 평가를 위한 차후 시험과정을 진행한다.
8. 성장기 동물 및 약령성숙 동물의 인지능력 평가를 위해 10 마리의 차세대동물(한배새끼 당 투여군 별로 암수 각각 10 마리씩으로 구성)을 사용한다. 생후 23 일 및 약령성숙동물에 대한 인지기능시험을 위해서는 서로 다른 동물이 사용된다. 시험종료 시에, 약령성숙동물로서 시험에 사용된 10 마리에 대해서는 치사시킨 후 뇌의 중량을 측정한다.
9. 시험을 위해 선택되지 않은 나머지 차세대 동물은 이유시키는 날에 치사 및 폐기시킨다.

표 2

출생자수 ^a 수컷/암컷		배정된 출생자수	검사/시험
1	5	20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	초기 행동발달 생후 11 일 뇌중량/신경병리학/형태계측
2	6	20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	상세한 임상 관찰 자발운동량 성적 성숙 운동 및 감각 기능 성숙동물 뇌중량/신경병리학/형태계측 ~ 생후 70 일
3	7	10 수 + 10 암 ^b	학습과 기억(생후 23 일)
3	7	10 수 + 10 암 ^b	학습과 기억(성체) 성숙 동물의 뇌중량
4	8		생후 21 일에 동물들을 치사시키고 폐기

- a) 이 사례에서는, 한배새끼는 4 마리의 수컷과 4 마리의 암컷으로 추려진다. 수컷 차세대동물은 1에서 4까지, 암컷 차세대동물은 5에서 8까지 번호를 매긴다.
- b) 생후 23 일 및 약령성숙동물의 인지능력시험에는 서로 다른 차세대동물이 사용된다.

사례 3

10. 뇌 중량 및 신경병리학 평가를 위해 한 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)을 생후 11 일 시점에 사용한다. 이들 동물 중 생후 11 일에 10 마리를 인도적으로 치사시키고 뇌 중량을 측정 한 후, 조직 병리학적 평가를 위한 조직고정 등 차후 과정을 진행한다. 또한 포르말린 고정 에 사용하지 않은 투여군당 나머지에 대해서도 뇌 중량을 측정한다.
11. 또 다른 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)에 대해서는 초기행동발달(운동활성), 이유후 검사(운동능력 및 성숙의 일련평가), 그리고 성장기의 인지능력검사를 실시한다.
12. 또 다른 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)은 운동, 감각기능검사(청각반응) 및 자세한 임상관찰을 위해 사용한다. 이 가운데, 10 마리는 시험종료 시점에(대략 생후 70 일) 마취시킨 후 관류방식으로 고정시킨다. *In situ* 방법으로 추가 고정 후, 뇌를 채취해 신경병리학적 평가를 위한 차후 시험과정을 진행한다.
13. 다른 세트의 20 마리 차세대동물(한배새끼 당 암수 각각 1 마리씩을 취하되 투여군 별로 20 마리씩으로 구성)은 약령성숙동물의 인지기능검사에 사용된다. 이 가운데, 10 마리는 시험종료 시에 치사시키고, 뇌 중량을 측정한다.

표 3

출생자수 ^a 수컷/암컷		배정된 출생자 수	검사/시험
1	5	10 수 + 10 암 10 수 + 10 암	생후 11 일 뇌중량/신경병리학/형태계측 생후 11 일 뇌중량
2	6	20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 20 수 + 20 암	초기행동발달 운동활성 성적 성숙 학습과 기억(생후 27 일)
3	7	20 수 + 20 암 20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	청각놀람(청소년기 및 약령성숙동물) 상세한 임상 관찰 약령성숙동물의 두뇌무게/신경병리학/형태계측 ~ 생후 70 일
4	8	20 수 + 20 암 10 수 + 10 암	학습 및 기억(약령성숙동물) 약령성숙동물의 뇌중량

a) 이 사례에서는, 한배새끼는 4 마리의 수컷과 4 마리의 암컷으로 추려진다. 수컷 차세대동물은 1에서 4까지, 암컷 차세대동물은 5에서 8까지 번호를 매긴다.

제43항 피부흡수시험: 생체내 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 실험동물의 피부에 시험물질을 도포한 후 시험물질이 피부 층을 통과하여 전신순환에 도달하는 지 등 피부흡수에 관한 정보를 생산하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 비흡수량

시험물질을 노출시킨 이후 피부 표면으로부터 세척된 것과 노출 동안 피부로부터 휘발하는 것으로 보이는 양을 포함하여 흡수되지 않고 비폐쇄 커버에 남아있는 시험물질의 양

2.2. 흡수량

시험물질을 도포한 부위의 피부를 제거한 후 소변, 대변, 호기, 혈액, 조직, 사체 및 케이지 세척액에 잔류하는 시험물질의 양

2.3. 흡수가능량

시험물질을 도포한 부위의 피부를 세척한 후 피부 내 또는 피부의 표면에 잔류하는 시험물질의 양

II. 시험

1. 원리

털을 짧게 깎은 동물의 피부부위에 적절한 용량단계로 시험물질을 도포하여 일정 시간 노출시킨다. 이 기간 동안 배설물과 호기(呼氣)를 수집하며 샘플링이 끝난 후 동물을 처사 시키고 채혈한다. 시험물질 도포부위를 채취하여 분석하고, 배설되지 않은 물질은 사체에 남은 양으로 분석한다. 각 검체를 적절한 방법으로 분석하여 흡수량과 비흡수량을 산출한 후 경피흡수를 평가 한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

2.2.1 동물종의 선정

- (1) 가장 일반적으로 사용되는 종은 랫드이며 털이 없는 종이나 인간 피부의 흡수율과 유사한 피부 흡수율을 갖는 다른 종을 사용할 수도 있다. 흔히 사용되는 계통의 건강하고 젊은 성체 동물(암수 중 한 성별만 사용하며, 일반적으로 수컷을 사용)을 시험에 사용한다. 시험을 시작할 당시의 동물 체중의 분산은 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.
- (2) 각 시험물질 및 설정된 각각의 노출시간 마다 하나의 성별에 대해 최소 4 마리로 구성된 동물군을 사용한다. 수컷과 암컷의 피부 독성에 큰 차이가 있다면 보다 민감한 성별을 선택해야 한다.

2.2.2 사육 및 먹이 공급 조건

사육실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 $50\% \sim 60\%$ 가 되도록 유지한다. 동물은 개체별로 사육한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명암주기는 12 시간 간격으로 설정한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

2.2.3 시험동물의 준비

- (1) 동물은 실험실 조건에 적응하도록 시험 시작 전 최소 5 일 동안 개체 식별이 가능하도록 표시하고 케이지에 순화시킨다.
- (2) 시험물질을 도포하기 약 24 시간 전에, 각 동물의 어깨 및 등 부위의 피부를 제모하고 피부 표면을 아세톤으로 부드럽게 닦아 피지를 제거한다. 손상된 피부에서의 투과성과 손상되지 않은 피부에서의 투과성은 다르기 때문에 찰과상이 난 피부를 시험물질 도포부위에 포함하지 않도록 특별히 주의한다.

2.2 시험물질

2.2.1 시험물질

시험물질은 투과특성을 시험하는 대상이며 방사성 동위원소를 표지시키는 것이 가장 이상적이다.

2.2.2 시험물질 제제

시험물질 제제(예: 원재료를 희석하지 않은 경우, 희석한 경우, 또는 다른 물질과 함께 조제한 경우로서 피부에 도포할 시험물질을 함유한 것)는 사람이나 또는 동물에 사용되어온 것과 동일하거나 이와 유사한 것으로 한다.

3. 시험방법

3.1 피부도포

시험물질을 피부에 고르게 도포하되 고체의 경우는 $1 \text{ mg/cm}^2 \sim 5 \text{ mg/cm}^2$, 액체의 경우는 최대 $10 \text{ } \mu\text{l/cm}^2$ 수준으로 한다. 도포 후 해당 부위는 비폐쇄성 커버(예를 들어, 투과성 나일론 거즈 커버)를 사용하여 깨끗하게 유지하며 커버는 피부를 손상 시키거나 시험물질 제제를 흡수하거나 이와 반응하지 않는 것을 사용한다.

3.2 노출기간 및 시료채취

- (1) 노출기간은 시험물질 제제를 도포한 시점과 피부 세척에 의해 시험물질 제제가 피부로부터 제거되는 시점 간의 간격이다. 노출이 끝나면 실험동물은 예정된 시험일정이 끝나는 기간까지 대사케이지에서 사육한다. 정기적인 간격으로 독성/비정상 반응의 징후가 있는지 관찰하며 노출 종료 시에는 시험물질에 의한 피부자극성의 육안적 징후가 있는지 관찰한다.
- (2) 대사케이지는 시험기간 동안 소변과 대변을 별도로 각각 수집할 수 있도록 설계된 것으로 한다. 소변, 대변 및 수집액(예: ^{14}C - 이산화탄소 및 휘발성 ^{14}C - 화합물에 대한)은 각 샘플링 시간에 각 그룹에서 개별적으로 수집한다.
- (3) 배설물은 시험물질이 피부에 도포된 후 24 시간 및 실험 종료 시점까지 매일 수집하며 필요시 더 적절한 시점에 수집하거나 수집 시점을 추가할 수 있다.
- (4) 노출 기간이 끝나면 피부 커버를 각 동물로부터 분리하고 별도로 보관한 후 커버에 묻은 시험물질을 분석한다. 도포부위는 적절한 면봉을 사용하여 세정제로 3 회 이상 씻어 내고 건조시킨다. 사용한 면봉과 세제는 보관한 후 분석한다. 관찰 후 추후의 시점에서 다시 관찰할 예정이 있는 실험동물의 경우, 관찰 후 각각의 대사케이지로 다시 배치되기 전에 도포부위를 보호하기 위해 새로운 커버를 사용한다.

3.3 종료 시의 절차

- (1) 각 시험동물군 별로, 예정된 시간에 각각의 개별 동물을 치사시키고 혈액을 채취한 후 별도로 시험물질을 분석한다.
- (2) 피부 커버를 우선 들어내고 투여군의 도포 부위의 피부, 동일 위치에 해당하는 비투여군의 피부, 그리고 제모된 피부를 각 동물에서 분리하여 별도로 분석한다.
- (3) 시험물질 도포 부위를 랫드로부터 절제하여 보드에 고정시킨다. 피부 표면에 가벼운 압력을 가해 접착테이프를 붙이고 테이프를 각질층과 함께 떼어 낸다. 각각의 동물의 피부에 대해 테이프 작업을 시행하고 이때 얻은 각질층은 동일 용기에 모아 두고, 이후 각질층을 용해시키기 위한 조직 분해제를 첨가한다.
- (4) 각 동물의 사체와 주요 장기는 별도의 분석을 위해 분리하도록 한다.
- (5) 동물을 치사시켰을 때 방광에 있는 소변은 이전에 채취한 소변과 합쳐 놓는다. 일정에 따른 치사 시점에 대사케이지에서 배설물을 수집한 후에는 배설물 수집기는 적절한 용매로 세척하고 세척액은 분석을 위해 보관한다.

3.4 분석

채취한 시료에 대해 시험물질 분석을 실시하며 모든 시험에서 적절한 회수율 (즉, 방사능의 $100 \% \pm 10 \%$ 의 평균)이 달성되어야 한다. 통계 처리 시에는 각각의 시험의 반복에 대한 분산측정을 포함한다.

III. 시험자료 및 보고

1. 시험자료

- (1) 각각의 시험동물에 대해 각 시료를 채취한 시점마다 아래와 같이 시험물질 및/또는 대사체를 분석한다. 개별 동물의 시험자료 뿐만 아니라 동물군에 대한 시험자료도 보고한다.
 - 보호 장치에 묻어있는 양
 - 피부로부터 제거 될 수 있는 양
 - 피부에서 씻어 낼 수 없는 피부 내/외의 양
 - 채취된 혈액중의 양
 - 배설물 및 호기 중의 양(해당되는 경우)
 - 사체 및 사체로부터 분리된 장기에 남아있는 양

- (2) 배설물, 호기, 혈액 및 사체 내의 시험 물질 및/또는 대사 체의 양으로 부터 각 시점에서 흡수된 총량을 결정하며 노출 기간 동안 시험 물질에 노출 된 피부 cm^2 당 흡수된 시험물질의 양을 계산한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과의 보고사항으로는 아래와 같은 정보를 포함한다.

2.1 시험물질

- (1) 식별 데이터[예: 가능한 경우 CAS 번호; 출처; 순도(방사화학적 순도); 불순물; 로트 번호]
- (2) 물리적 성질, 물리 화학적 성질(예: pH, 휘발성, 용해도, 안정성, 분자량 및 log Pow)

2.2 시험물질 제제

- (1) 성분 및 해당물질의 사용에 대한 타당한 이유
- (2) 세부사항, 도포된 양, 도달 농도, 부형제(용매), 안정성 및 균질성

2.3 시험동물

- (1) 사용한 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령 및 성별
- (3) 동물의 공급원, 사육조건, 사료 등
- (4) 시험시작 시의 각 개별 동물의 체중

2.4 시험조건

- (1) 시험제제의 투여에 대한 세부사항(도포부위, 분석 방법, 폐쇄/비폐쇄, 부피, 추출, 검출)
- (2) 사료 및 음용수에 대한 세부 정보

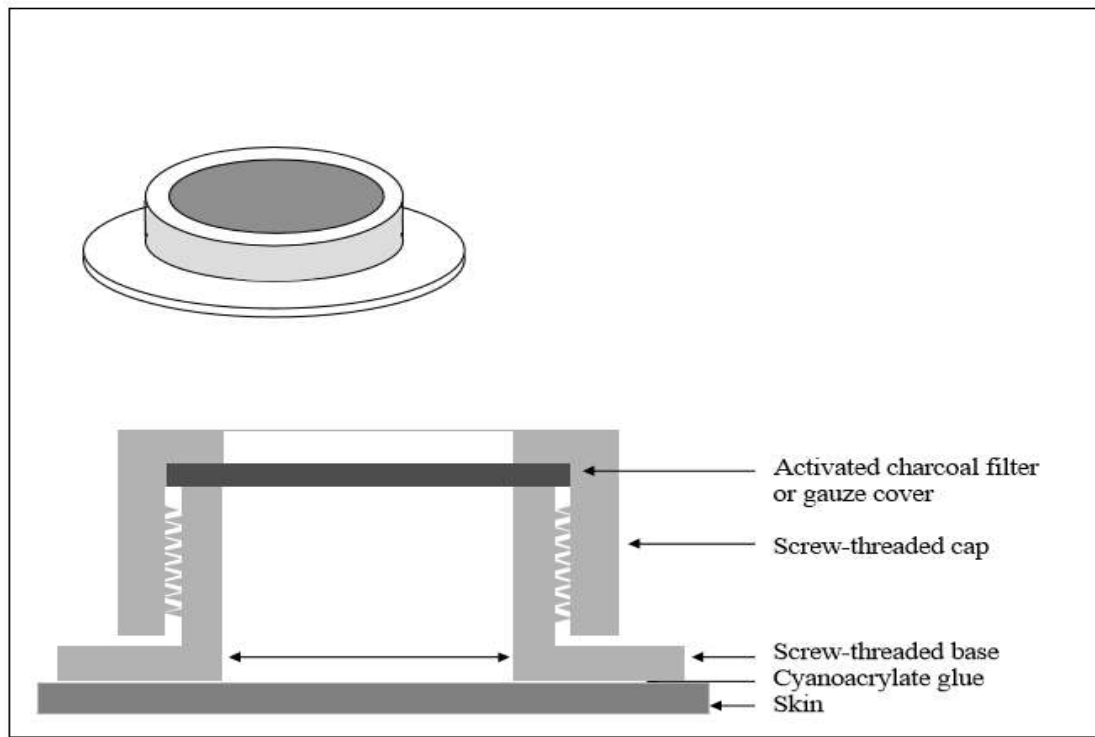
2.5 결과

- (1) 독성의 징후
- (2) 흡수데이터의 표(비율, 양 또는 백분율로 표시)
- (3) 실험의 총 회수율
- (4) 시험결과의 해석; 시험물질의 경피 흡수에 관한 이용가능한 모든 자료와의 비교 포함

2.6 결과에 대한 토론

2.7 결론

그림 1. 생체내 피부흡수시험에 사용되는 장치의 예



activated charcoal filter: 활성탄 필터

screw-threaded cap: 스크류 마개

screw-threaded base: 스크류 받침

cyanoacrylate glue: 접착제

skin: 피부

제44항 피부흡수시험: 생체의 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 동물로부터 적출한 피부에 시험물질을 도포한 후 시험물질이 피부층을 통과하여 전신순환에 도달하는지 등 피부흡수에 대한 정보를 생산하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 비흡수량

피부투과장치에 설치한 피부에 시험물질을 노출시킨 이후 피부 표면으로부터 세척된 것과 노출 동안 피부로부터 휘발하는 것으로 보이는 양을 포함하여 흡수되지 않은 시험물질의 양

2.2. 흡수량

피부투과장치에 설치한 피부에 시험물질을 노출시킨 이후 피부를 통과하여 수용체액에 도달한 시험물질 또는 대사체의 양

2.3. 흡수가능량

시험물질을 도포한 피부를 세척한 후 피부 내 또는 피부 표면에 잔류하는 시험물질의 양

II. 시험

1. 원리

피부투과장치에 존재하는 두 개의 챔버 사이에 장착시킨 피부표면에 시험물질을 도포하고 일정시간 동안 노출시킨 후 수용체액(receptor fluid, 시험물질이 피부를 통과할 경우 이를 받아내는 용매)을 취하여 시험물질/또는 대사체를 분석한다. 노출기간 동안의 흡수율은 시험계의 모든 구성요소에 대해 시험물질을 분석하고 흡수량과 비흡수량을 산출한 후 평가한다.

2. 시험 준비

2.1. 피부투과 장치

피부투과 장치는 공여실과 수용실 사이에 적출한 피부가 놓이게 되도록 고안되어 있다. 피부투과 장치는 적출된 피부의 가장자리를 잘 봉합할 수 있어야 하며, 샘플링이 쉽고, 온도조절이 쉬우며, 피부의 밑면과 접촉하는 수용체액이 잘 혼합될 수 있는 것이라야 한다. (예: 그림 1)

2.2. 수용체액

생리적으로 적절한 용액을 사용하며, 구성성분을 정확히 제시한다. 또한 시험물질을 충분히 용해시켜야 하며 준비된 피부조직에 영향을 미치지 않아야 한다. 시험물질의 대사체 분석을 동시에 수행할 경우에는 수용체액은 시험기간 동안 피부 세포의 생존에 나쁜 영향을 미치지 않아야 한다.

2.3 온도

화학물질의 피부 흡수는 온도에 영향을 받으므로 피부투과 장치와 피부는 정상 피부 체온에 가까운 일정한 온도 ($32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$)로 유지되어야 하며, 습도는 되도록이면 30 % ~ 70 %로 유지되어야 한다.

2.4 시험용 피부의 제작

- (1) 시험용 피부는 사람이나 동물의 피부를 사용할 수 있으며 사람의 피부를 사용할 경우에는 국내 및 국제적인 윤리조항이나 조건에 부합하여야 한다.
- (2) 세포가 살아있는 피부가 선호되지만, 만약에 피부조직의 구조적 온전함이 입증될 수 있다면 죽은 피부도 사용할 수 있다.
- (3) 효소, 열 또는 화학적 방식으로 분리한 표피막이나, 일반적으로 $200\text{ }\mu\text{m} \sim 400\text{ }\mu\text{m}$ 두께의 부분피부층도 실험에 사용할 수 있다. 피부의 전층을 사용할 수 있으나 과도한 두께의 피부 (약 $> 1\text{ mm}$)를 사용하는 것은 피해야 한다.

2.5 시험용 피부의 완전성

- (1) 시험용 피부에 대한 부적절한 취급은 각질층을 손상시킬 수 있으므로 제작된 피부에 대해서는 그 완전성이 확보되어야 한다. 피부에서 시험물질의 대사를 살펴볼 필요가 있을 때에는 갓 절제된 신선한 피부를 사용하며, 대사활성이 확인된 조건하에서 사용한다.

- (2) 일반적 시험법에서 갓 절제된 피부는 24 시간 이내에 사용하지만, 대사와 관련된 효소시스템 및 보관온도에 따라 허용 가능한 보관기간은 다를 수 있으므로 주의한다.

2.6 시험물질

시험물질은 투과특성을 시험하는 대상이며 방사성 동위원소를 표지시키는 것이 가장 이상적이다.

2.7 시험물질 제제

시험물질 제제(예: 원재료를 희석하지 않은 경우, 희석한 경우, 또는 다른 물질과 함께 조제한 경우로서 피부에 도포할 시험물질을 함유한 것)는 사람 또는 동물에 사용한 것과 동일하거나 이와 유사한 것으로 한다.

2.8 시험물질 농도와 제형

시험물질의 농도는 두 농도 이상으로 설정하며 잠재적 인체 노출이 가능한 실제 농도 범위를 포함하도록 한다.

3. 시험방법

3.1 피부도포

시험물질은 피부에 고르게 도포하되 인체의 노출과 유사한 조건으로 피부에 노출시키기 위해 고체의 경우는 $1 \text{ mg/cm}^2 \sim 5 \text{ mg/cm}^2$, 액체의 경우는 최대 $10 \text{ } \mu\text{l/cm}^2$ 수준으로 한다. 도포량의 결정은 예상 사용조건, 시험목적 또는 시험물질 제제의 물리적 특성 등에 대한 근거를 바탕으로 한다.

3.3 노출과 샘플링 기간

- (1) 시험물질의 노출기간은 인체 노출의 유형에 따라 결정된다. 노출 후에는 적절한 세정제로 과잉의 시험물질을 세척하며, 이때 이행된 시험물질을 분석하기 위해 세척액은 따로 모아둔다.
- (2) 피부를 빠르게 투과하는 시험물질과는 달리 느리게 피부를 투과하는 시험물질에 대해서는 노출 시간을 더 길게 할 수도 있다.
- (2) 흡수 프로파일의 특성을 얻기 위해서는 대개 24 시간의 샘플링 기간이 필요하

며, 시험물질의 흡수 프로파일이 그래픽으로 표시될 수 있도록 수용체액의 샘플링 빈도를 조절한다.

3.4 종료 시의 절차

공여실, 피부표면 세척액, 시험용 피부, 수용체액 및 수용실을 포함하여 시험계의 모든 구성요소에 대해 시험물질을 분석한다. 경우에 따라 피부는 노출부위, 셀 플랜지(flange) 아래 부위, 각질층, 표피, 진피 부위로 구분하고, 이들 각각에 대해 분석할 수도 있다.

3.5 분석

모든 시험에서 방사능의 $100\% \pm 10\%$ 에 해당하는 적절한 회수율이 확보되어야 한다. 수용체액, 시험용 피부, 피부 표면 세척액 및 기구 세척액에서 시험물질의 양은 적절한 수단을 사용하여 분석한다.

III. 시험자료 및 보고

1. 시험자료

- (1) 수용체액의 분석, 시험 장치에서의 시험물질의 분포 값 및 시간에 따른 흡수프로파일을 제시한다. 노출이 한정적 용량조건으로 이루어진 경우, 피부에서 세척된 양, 피부에 결합된 양 (그리고 분석하였다면 피부의 서로 다른 층에서의 양), 및 수용체액에 존재하는 양 (도포된 투여량에 대한 비율, 양 또는 백분율)을 계산한다.
- (2) 피부흡수는 때때로 수용체액에서의 데이터만으로 나타낼 수 있다. 그러나 시험 종료 시 피부에 시험물질이 남아있을 때는 흡수된 총량에 포함될 필요가 있다. 무제한적 용량조건으로 도포된 경우, 투과율 상수(K_p)의 계산이 가능하며 흡수율을 백분율로 계산하는 것은 적절하지 않다.

2. 시험결과의 보고

시험결과의 보고사항에는 아래와 같은 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질

물리적 성질, 물리화학적 성질(적어도 분자량과 $\log P_{ow}$), 순도(방사화학적 순도)

- (1) 식별 정보(예: 배치 번호)
- (2) 수용체액에서의 용해도

2.2. 시험물질 제제

- (1) 제형(제제의 성분) 및 해당물질의 사용에 대한 타당한 이유
- (2) 균질성

2.3. 시험조건

- (1) 시험용 피부의 유래 및 해당 부위, 제작 방법, 사용 전 보관 조건, 모든 전처리(세척, 항생제 처리 등), 피부의 완전성 측정, 대사 상태, 사용의 타당성
- (2) 피부투과장치의 셀 디자인, 수용체액의 조성, 수용체액의 유량 또는 샘플링 시간과 절차
- (3) 시험 제제의 도포 및 도포된 용량에 관한 세부사항
- (4) 노출 기간
- (5) 피부로부터 시험제제물질을 제거하는 과정; 예를 들어 피부세정 등
- (6) 피부분석에 관한 세부사항과 피부 각 층에서의 시험물질 분포를 입증하기 위해 사용된 피부층의 분리기술
- (7) 피부투과 장치의 셀 및 장비의 세척 절차
- (8) 정량 방법, 추출 기술, 검출 한계와 분석 방법의 검증

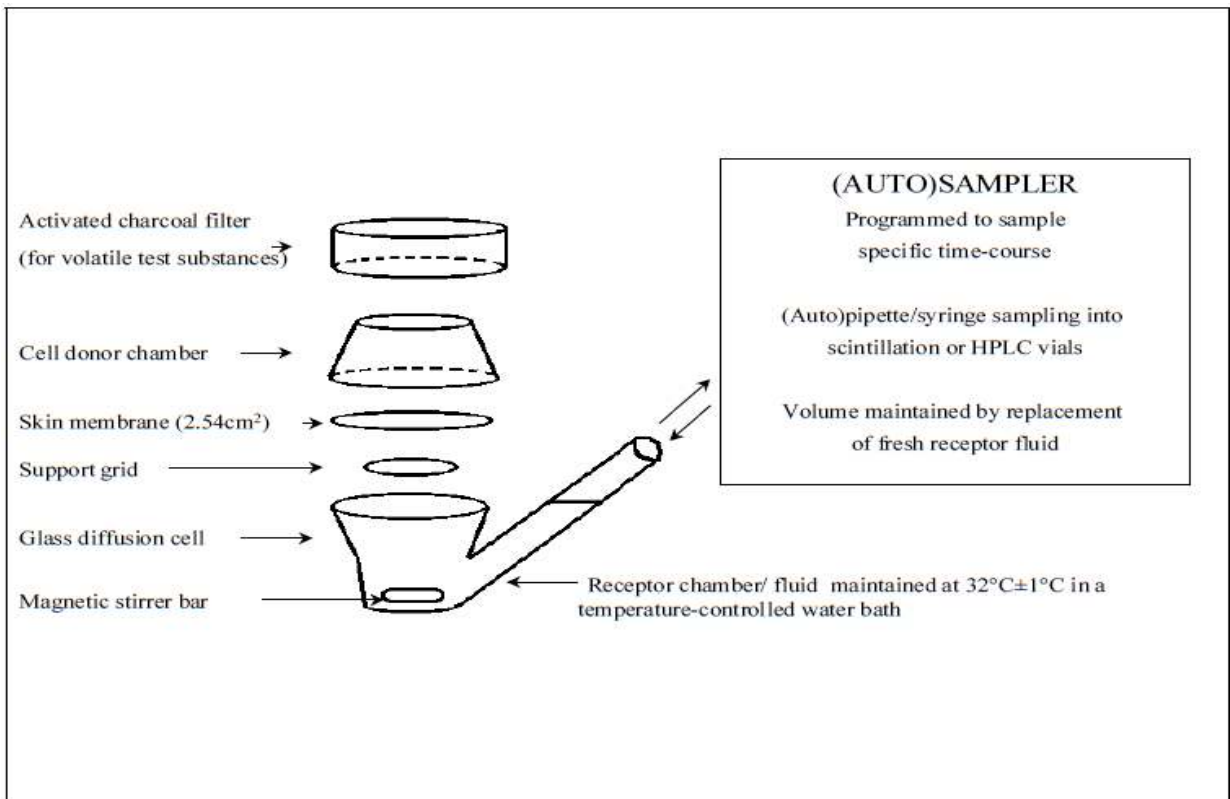
2.4. 결과

- (1) 실험의 전체 회수율(적용된 투여량 = 피부 세척액 + 피부 + 수용체액 + 피부투과장치 세척액)
- (2) 각 셀 개별 구획의 회수율에 대한 표
- (3) 흡수 프로파일
- (4) 표로 작성된 흡수 데이터(비율, 양 또는 백분율)

2.5. 결과에 대한 토론

2.6. 결론

그림 1. 생체의 피부흡수시험을 위한 정적 확산 셀



activated charcoal filter: 활성탄 필터

(for volatile test substance: 휘발성물질용)

cell donor chamber: 공여실

skin membrane: 피부막

support grid: 보조격자

glass diffusion cell: 유리확산실

magnetic stirrer bar: 자기회전막대

receptor chamber/fluid maintained at 32 °C ± 1 °C in a temperature-controlled water bath

수용실/수용체액: 온도조절기능 수욕조에서 32 °C ± 1 °C 로 유지됨

(Auto) sampler: (자동) 샘플링장치

programmed to sample specific time-course: 시료에 따라 시간조정이 가능하게 프로그램

(Auto) pipette/syringe sampling into scintillation or HPLC vials

: 바이알에 샘플을 (자동)주입하는 피펫/주사기

Volume maintained by replacement of fresh receptor fluid: 새로운 수용체액으로 교환하여 부피를 유지

제45항 생체외 3T3 NRU 광독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질이 빛에 노출된 후 여기되어 유발하는 광독성을 평가하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 광독성(Phototoxicity)

화학물질이 피부에 적용되거나 전신투여된 후 피부가 빛에 노출되었을 때 나타나는 급성 독성 반응

2.2. 광자극지수(PIF, Photo Irritation Factor)

시험물질 처리 후 세포독성을 일으키지 않는 자외선/가시광선의 조사유무에 따른 세포독성 IC_{50} 값을 비교하여 생성된 지수

2.3. IC_{50}

세포의 생존율을 50 % 감소시키는 시험물질의 농도

2.4 평균 광효과(MPE, Mean Photo Effect)

시험물질 처리 후 세포독성을 일으키지 않는 자외선/가시광선의 조사유무에 따른 농도 반응 곡선을 수학적으로 계산하여 얻은 값

II. 시험

1. 원리

In vitro 3T3 NRU (Neutral Red Uptake) 광독성 시험은 세포독성을 유발하지 않는 수준의 인공 태양광의 노출 유무에 따른 화학물질의 세포독성을 비교하는 것에 기

반하고 있다. 이 시험에서 세포독성은 시험물질 처리 및 조사 18 시간 ~ 24 시간 후 생염료인 Neutral Red (NR) 흡수의 농도의존적 감소 정도를 측정하여 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1. 세포

- (1) 불멸화 마우스 섬유아세포 세포주인 Balb/c 3T3 clone A31 (ATCC, American Type Culture Collection 또는 ECACC, European Collection of Cell Cultures)이 검증 연구에 사용되었으며 신뢰할 수 있는 적절한 세포주 은행에서 얻은 이 세포주의 사용을 권장한다. 배양조건이 세포의 특이 조건에 적합하다면 다른 세포나 세포주를 사용할 수 있지만 이 시험에 사용하는 세포주와의 동등함을 반드시 입증해야 한다.
- (2) 세포가 마이코플라스마에 오염이 되지 않았는지를 정기적으로 검사하며 오염이 없는 세포를 사용한다.
- (3) 세포의 UV 민감도를 정해진 지침의 품질관리 방법(OECD TG432 부록 3 참조)에 따라 정기적으로 검사한다. 세포의 UVA에 대한 민감도는 계대수(Passage number)와 관련되어 있으므로, 100 계대 미만의 가능한 최소 계대수의 Balb/c 3T3 세포를 사용한다. 권장 계대수 이상의 세포를 사용하는 경우 세포가 이 시험법에서 요구하는 질적 수준에 적절한지를 입증해야 한다.

2.2. 배지와 배양조건

- (1) 적합한 배양 배지와 배양 조건을 사용한다. Balb/c 3T3 세포의 경우 10 % NBCS (New-Born Calf Serum), 4 mM 글루타민, 페니실린(100 IU) 및 스트렙토마이신(100 μ g/mL) 등이 포함된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)을 배지로 사용하며 37 °C, 완충액에 따라 5 % ~ 7.5 % CO₂의 습윤한 조건에서 배양한다.
- (2) 냉동 보관된 세포를 적절한 밀도로 배양 배지에 접종하여 *in vitro* 3T3 NRU 광독성 시험을 진행하기 전에 적어도 한 번 계대 배양을 한다.
- (3) 광독성 시험에 사용될 세포는 적절한 밀도로 배지에 분주하여 시험 종료 시(세

포 분주 48 시간 후 세포 생존율을 결정하는 시기) 세포가 플레이트 바닥 전체를 덮어 과밀하지 않도록 한다. 96 웰 플레이트에서 배양하는 Balb/c 3T3 세포에 대해 권고되는 배양 밀도는 1×10^4 세포/웰이다.

- (4) 시험물질 1 개 당 각각 2 개의 96 웰 플레이트에 동일한 배양 조건으로 세포를 배양한다. 1 개의 플레이트에는 UV를 조사하고(+Irr) 다른 1 개는 차광 상태로 두는(-Irr) 과정을 제외하곤 동일하게 진행한다.

2.3. 시험물질

- (1) 보관 조건에서 그 안정성을 입증할 수 있는 자료가 없는 한, 시험물질은 사용 직전에 새로 조제한다. 모든 시험물질 취급과 처리는 시험물질이 UV 조사 전에 광 활성화되거나 분해되지 않는 조건하에서 수행한다. 시험물질은 UV 조사 중 간섭을 피하기 위해 단백질 성분이나 광 흡수 성분(예: 페놀레드 같은 pH-지시약, 비타민) 등이 없는 완충액[예: EBSS (Earle's Balanced Salt Solution) 또는 HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)] 또는 생리 완충액에 녹인다.
- (2) 물에 잘 녹지 않는 시험물질은 적절한 용매에 녹여야 한다. 용매의 함량은 모든 농도의 시험물질과 용매 대조군에서 같아야 하고, 그 농도에서 세포독성이 나타나지 않아야 한다. 용매로는 DiMethylSulphOxide (DMSO)와 에탄올(EtOH)이 권장된다.
- (3) 시험물질을 유기 용매(DMSO 등)에 녹여 조제한 경우에는 동일한 용매에 8 개의 단계 희석액을 조제한 후 수성 용매(HBSS 등)에 옮겨서 세포에 적용한다. 수성 용매 중의 최종 유기 용매의 농도는 8 개 시험 농도 모두에서 같아야 한다. [일반적으로 1 % (v/v)]. 시험물질을 유기 용매에서 수성 용매로 옮길 때에 침전물이 생성될 수 있으며, 이 경우에는 시험물질의 용해도에 대한 평가를 실시하여야 하며, 아울러 침전 등의 관찰결과를 기록한다.
- (4) UV 조사(+Irr) 및 UV 비조사(-Irr) 시 시험물질의 농도범위는 용량범위 결정 실험을 통해 적절하게 결정한다. 용해도는 광 노출 시간 또는 노출 과정에 따라 변화할 수 있기 때문에 처음과 60 분 후(또는 계획된 처리 시간)에 용해도를 평가해 보는 것이 좋다. 부적절한 배양조건, 강산성, 강염기성 화학물질에 의해

유도되는 독성을 피하기 위해 세포배양 및 시험물질 처리 시 pH는 6.5 ~ 7.8 범위 내에 있어야 한다.

- (5) 시험물질의 최고 농도는 삼투압이나 pH 스트레스를 주지 않는 생리적 허용 범위 내에 있어야 한다. 시험물질에 따라 최고농도를 제한하는 요소로서 다른 물리화학적 특성들을 고려할 수도 있다. 상대적으로 불용성이며 포화농도에서 무독성인 물질에 대해서는 도달할 수 있는 최대 농도에서 시험한다.
- (6) 시험물질의 최대 농도는 1000 $\mu\text{g/mL}$ 을 초과해서는 안 된다. 최고 농도를 일정한 희석 비율로 등비 희석하여 8 개의 시험물질 농도를 정한다.
- (7) 만약 농도 범위 결정시험에서 시험물질의 한계농도에서도 UV 비조사(-Irr) 시에는 세포독성이 없지만 UV 조사(+Irr) 시 세포독성이 강하게 나타났다면, UV 조사 시의 농도범위를 UV 비조사 시의 농도범위와 다르게 선택할 수 있다.

2.4. 대조군

- (1) 양성대조물질로는 Chlorpromazine (CPZ)을 권장한다. 시험물질의 화학적 분류 및 용해도 특성을 고려하여 적합한 CPZ 대신 다른 광독성 물질도 양성대조군으로 사용할 수 있다.
- (2) In vitro 3T3 NRU 광독성시험을 표준 프로토콜에 따라 시험한 경우, 양성대조군(CPZ)에 대한 시험 성립 기준은 다음과 같다.
 - 조사 CPZ (+Irr)의 IC_{50} : 0.1 $\mu\text{g/mL}$ ~ 2.0 $\mu\text{g/mL}$
 - 비조사 CPZ (-Irr)의 IC_{50} : 7.0 $\mu\text{g/mL}$ ~ 90.0 $\mu\text{g/mL}$
 - $\text{PIF} > 6$
- (3) In vitro 3T3 광독성시험을 수행하는 실험실은 평균 광효과(MPE)를 포함하여 양성대조군 시험을 포함한 과거의 기록을 모니터링하고 관리하여야 한다.
- (4) 조사 조건에서의 용매 대조군의 세포생존율은 비조사 조건에서의 용매 대조군과 비교하여 80 % 이상이어야 하며, 용매 대조군의 평균 $\text{OD}_{540 \pm 10}$ NRU 값은 0.4 이상이어야 한다.

2.5. 광조사기

- (1) 최적의 인공광원으로 인공태양광조사기(Solar simulator)를 고려한다. 필터를 장착한 태양광조사기의 광도 분포는 한낮 야외의 광도 분포와 유사하여야 한다. 제논 아크(Xenon arc)와 수은-할로젠(피착) 아크(Mercury-metal halide arc)는 둘 다 인공 태양광 조사장치로 사용된다. 모든 인공태양광 조사장치가 상당량의 UVB를 방출하기 때문에 세포독성이 매우 강한 UVB를 줄이기 위해서는 필터를 장착한다. 세포 배양용 플라스틱 재료들이 UV 안정화제를 함유하기 때문에 시험분석 시 사용하는 것과 동일한 96 웰 플레이트의 뚜껑을 통과하는 빛의 스펙트럼을 측정한다. 장착된 필터 또는 실험기구에 의해 여과된 스펙트럼 측정값은 표준화된 실외광을 벗어나지 않도록 한다.
- (2) 광량 측정: 광의 세기(조도, Irradiance)는 광독성 시험 전에 적절한 광대역 UV 측정기를 사용하여 정기적으로 점검한다. 광의 세기는 시험에 사용하는 것과 동일한 96 웰 플레이트 뚜껑을 통과하는 스펙트럼으로 측정한다. UV 측정기는 광원에 대하여 보정한다. UV 측정기의 정상 작동 여부를 점검하며, 이를 위해 같은 종류인 제 2의 참조용 UV 측정기를 이용해 같은 방법으로 보정할 것을 권장한다. 이상적으로는 긴 시간 간격을 두어 분광복사기를 사용하여 여과된 광원의 스펙트럼 조도를 측정하고 UV 측정기를 보정한다.
- (3) UVA 영역에서 5 J/cm^2 의 광량은 Balb/c 3T3 세포에 대한 독성이 없으면서 화학물질을 활성화시켜 광독성 반응을 일으키기에 충분한 것으로 알려졌다. 예를 들어 50 분 내에 5 J/cm^2 에 도달하기 위해 광세기는 1.7 mW/cm^2 로 조정되었다. 광 노출 시간은 다음과 같이 계산한다.

$$t(\text{분}) = \frac{\text{광조사량}(\text{J/cm}^2) \times 1000}{\text{광세기}(\text{mW/cm}^2) \times 60} \quad (1 \text{ J} = 1 \text{ Wsec})$$

3. 시험방법

3.1. 세포 접종(첫째 날)

- (1) 배지 $100 \mu\text{L}$ 를 96 웰 플레이트 외곽 웰에 분주하여 blank를 만든다. 나머지 웰에는 배지에 부유시킨 세포 현탁액(1×10^5 세포/mL) $100 \mu\text{L}$ 를 접종한다($1 \times$

10⁴ 세포/웰). 각 시험물질 농도군 및 음성/양성 대조군에 대해 2 개의 플레이트를 준비한다.

- (2) 플레이트를 18 시간 ~ 24 시간 배양하여 각 웰 바닥 면적의 반 정도가 단층 배양세포로 충분히 채워지도록 한다.

3.2. 시험물질 처리 및 UV 조사(둘째 날)

- (1) 배양 후 배지를 버리고 완충액 150 μ L로 조심스럽게 세척한다. 적절한 농도의 시험물질 또는 용매(용매대조군)를 포함하는 완충액 100 μ L를 각 웰에 첨가하고 세포배양기에서 60 분간 차광상태에서 배양한다. 시험물질은 8 개 농도를 사용한다.
- (2) 각 물질에 대해 준비된 2 개의 플레이트 중 하나는 세포독성 결정(-Irr, Control plate)에, 다른 하나는 광세포독성 결정(+Irr, Treatment plate)에 사용한다.
- (3) UV 조사 단계에서 세포독성이 없는 최대량으로 플레이트 뚜껑을 덮은 채로 약 50 분간 상온에서 조사한다. UV 조사하지 않는 플레이트는(-Irr) 50 분(광 노출 시간) 동안 상온에서 어두운 곳에 둔다.
- (4) 시험물질 용액을 버리고 150 μ L의 시험물질을 포함하지 않는 완충액으로 조심스럽게 2 번 세척한다. 세척 후 배지를 첨가하고 하룻밤(18 시간 ~ 24 시간) 동안 배양한다.

3.3. 현미경 관찰(셋째 날)

- (1) 위상차 현미경을 사용하여 세포의 성장, 형태, 단층의 완전성을 조사한다. 세포의 형태 변화와 세포 성장에 대한 영향을 기록한다.

3.4. Neutral Red Uptake (NRU) 시험

- (1) 예열한 완충액 (37 $^{\circ}$ C) 150 μ L로 세포를 세척한 후 세척용액을 제거한다. 혈청을 함유하지 않은 배지에 50 μ g/mL로 녹인 Neutral Red (3-Amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride, CAS 번호 553-24-2; C.I. 50040) 100 μ L를 첨가하여 3 시간 동안 배양한다.

- (2) 배양 후 NR 배지를 제거하고 완충액 150 μ L으로 세척한다. 남은 완충액은 빨아들이거나 원심분리를 통해 제거한다.
- (3) NR 추출액 150 μ L(물 : 에탄올 : 아세트산 = 49 : 50 : 1 용시 조제)를 각 웰에 첨가한다.
- (4) 세포로부터 NR이 용출되어 균질한 용액이 형성될 때까지 마이크로타이터 플레이트 교반기 위에서 최소 10 분 동안 천천히 교반시킨다.
- (5) 분광광도계를 사용하여 540 nm \pm 10 nm에서 NR 추출액의 흡광도를 측정하고 기준을 잡기 위해 Blank를 사용한다. 차후 분석을 위해 결과를 전자 파일로 저장한다.
- (6) Neutral Red (NR) 용액의 pH 변화로 인하여 NR 결정(Crystals)이 형성될 경우 세포 배양배지에 pH 안정화제(예, HEPES)를 첨가하여 결정 형성을 방지할 수 있다. Neutral Red 원액의 사전 검증, 세포 배양배지에서 Neutral Red 용액의 여과 또는 원심분리를 권장한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

1.1. 광자극지수 또는 평균 광효과를 계산하여 시험결과를 평가한다.

1.2. 적절한 연속 용량-반응 곡선(모델)을 이용해 용량-반응 값을 구하여 광 세포독성 측정 값을 계산한다(아래 참고). 곡선을 시험 결과에 맞출 때에는 보통 비선형 회귀 분석법을 이용한다.

$$\text{광자극지수 (PIF)} = \frac{\text{IC}_{50} \text{ (-Irr, UV 비조사조건)}}{\text{IC}_{50} \text{ (+Irr, UV 조사조건)}}$$

1.3. 만약 UV 조사 또는 비조사시 IC_{50} 를 계산할 수 없다면, 시험물질에 대한 PIF 값은 결정할 수 없다. 이때는 평균 광효과(MPE) 값을 사용하는데 이는 농도-반응 곡선의 차이에 근거한다. MPE는 n 개의 PE 값의 가중평균으로 정의한다.

$$MPE = \frac{\sum_{i=1}^n w_i PE_{C_i}}{\sum_{i=1}^n w_i}$$

$$PE_C = RE_C \times DE_C$$

PE_C : 농도 C에서의 광 효과

RE_C : 농도 C에서의 반응 효과 = $R_C(-Irr) - R_C(+Irr)$

: UV 조사 유무 시 관찰되는 반응 값의 차이

DE_C : 농도 c에서의 용량 효과

$$DE_C = \left| \frac{C/C^*-1}{C/C^*+1} \right|$$

C^* : 등가농도

: UV 조사(+Irr)시 반응과 UV 비조사 시(-Irr) 반응이 같은 시험물질 농도

만약 UV 조사 시 (+Irr) 반응 값이 UV 비조사 시의 반응 값보다 매우 크거나 작아서 C^* 이 결정되지 않으면 용량 효과는 1로 한다.

w_i (가중치) = $\text{MAX} \{R_i (+Irr), R_i (-Irr)\}$

: UV 조사 시(+Irr)와 UV 비조사 시(-Irr) 반응값의 최댓값

Concentration grid C_i 는 실험에 사용된 농도 값 사이의 간격에 같은 수의 점이 나타나도록 선택한다. MPE 계산은 두 곡선 중 최소 한 곡선이 최소 10 % 의 반응 값을 나타내는 최대 농도에 제한된다. 만약 최대 농도가 +Irr 실험에 사용되는 최고 농도보다 높으면 +Irr 곡선의 나머지 부분의 반응값은 “0” 으로 설정한다. MPE 값이 0.15(Cut-off value) 보다 크면 광독성으로 분류한다 ($MPE_c \geq 0.15$).

1.4. PIF값 및 MPE값은 소프트웨어(Phototox 2.0, ZEBET at the BfR, Berlin, Germany)를 사용하여 계산할 수 있다. (Source: <http://www.oecd.org>)

1.5. 시험결과의 해석

- (1) 검증연구에 근거하여, $PIF < 2$ 또는 $MPE < 0.1$ 이면 시험물질은 ‘광독성 없음’으로 예측한다. $2 \leq PIF < 5$ 또는 $0.1 \leq MPE < 0.15$ 이면 ‘광독성 미정’으로, $PIF \geq 5$ 또는 $MPE \geq 0.15$ 이면 ‘광독성 있음’으로 예측한다.

예측	PIF	MPE
광독성 없음	$PIF < 2$	또는 $MPE < 0.1$
광독성 미정*	$2 \leq PIF < 5$	또는 $0.1 \leq MPE < 0.15$
광독성 있음	$PIF \geq 5$	또는 $MPE \geq 0.15$

* Equivocal phototoxicity

1.6. 숙련도 시험

본 시험법에 따라 시험을 수행하는 실험실은 사전에 이미 충분한 숙련도가 있음을 입증하여야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 숙련도 시험대상 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표에 제시된 바와 일치하는 지를 확인하여야 한다.

표 1. 숙련도 물질

화학물질	CAS 번호	PIF	MPE	광독성	흡수 피크
Amiodarone HCl	19774-82-4	> 3.25	$0.27 \sim 0.54$	Yes	242 nm 300 nm (shoulder) in ethanol
Chlorpromazine HCl	69-09-0	> 14.4	$0.33 \sim 0.63$	Yes	309 nm in ethanol
Norfloxacin	70458-96-7	> 71.6	$0.34 \sim 0.90$	Yes	316 nm in acetonitrile
Anthracene	120-12-7	> 18.5	$0.19 \sim 0.81$	Yes	356 nm in acetonitrile
Protoporphyrin IX, Disodium	50865-01-5	> 45.3	$0.54 \sim 0.74$	Yes	402 nm in ethanol
L-Histidine	7006-35-1	no PIF	$0.05 \sim 0.10$	No	211 nm in water
Hexachlorophene	70-30-4	$1.1 \sim 1.7$	$0.00 \sim 0.05$	No	299 nm 317 nm (shoulder) in ethanol
Sodium lauryl sulfate	151-21-3	$1.0 \sim 1.9$	$0.00 \sim 0.05$	No	no absorption in water

1.7. 시험 자료의 해석

- (1) 시험물질의 최고농도에서만 광독성이 나타나면(특히 수용성인 시험물질인 경우), 유해성 평가를 위해 피부 흡수 및 축적, 기타 시험자료(예: 활성산소종 측정을 이용한 광반응성 시험(ROS 시험), *In vitro* 동물 피부나 인체 피부 시험 또는 피부모델) 등을 추가적으로 고려할 필요가 있다.
- (2) 시험물질이 자외선 노출여부와 관계없이 독성이 나타나지 않고, 용해도가 낮아 농도 설정이 어려운 경우 본시험 적용보다는 다른 모델을 이용하는 확인 시험을 고려한다.

2. 시험결과와 보고

시험결과와 보고는 다음 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질

- 2.1.1. 시험물질의 식별자료: 일반명, IUPAC, CAS 번호(알려져 있을 경우)
- 2.1.2. 물리적 성상 및 순도
- 2.1.3. 시험 수행과 관련된 물리화학적 특성
- 2.1.4. 자외/가시부 흡수스펙트럼(UV/vis absorption spectrum)
- 2.1.5. 안정성, 광안정성(알려져 있을 경우)

2.2. 용매

- 2.2.1. 용매 선택 사유
- 2.2.2. 용매에 대한 시험물질의 용해도
- 2.2.3. 처리 배지에서 용매의 백분율

2.3. 세포

- 2.3.1. 세포의 종류 및 근원
- 2.3.2. 마이코플라스마 유무 및 다른 미생물의 오염 유무
- 2.3.3. 세포 계대수(알려져 있을 경우)
- 2.3.4. 세포의 광조사 민감도(*In vitro* 3T3 NRU 광독성시험에 사용한 조사장치로 측정)

2.4. 시험조건

2.4.1. 시험물질 처리 전후 배양조건

2.4.1.1. 배지의 종류 및 조성

2.4.1.2. 배양조건(CO_2 농도, 온도, 습도)

2.4.1.3. 배양기간(처리 전, 처리 후)

2.4.2. 시험물질 처리조건

2.4.2.1. UV 조사 및 비조사 시 시험물질 농도 설정 근거

2.4.2.2. 시험물질의 용해도 제한이 있는 경우와 세포독성이 없는 경우, 시험물질 최고농도에 대한 근거

2.4.2.3. 시험물질 처리 배지에 대한 종류 및 조성(완충액)

2.4.2.4. 시험물질 처리 기간

2.4.3. 광조사

2.4.3.1. 광원의 선택 근거

2.4.3.2. 광원과 복사계(Radiometer)의 제조사 및 종류

2.4.3.3. 광원의 스펙트럼 특성

2.4.3.4. 필터의 투과 및 흡수 특성

2.4.3.5. 복사계의 특성 및 보정

2.4.3.6. 광원과 시험계 간의 거리

2.4.3.7. UVA 광세기: mW/cm^2 로 표시

2.4.3.8. 자외선/가시광선 노출 기간

2.4.3.9. UVA 광량(세기 \times 시간): J/cm^2 로 표시

2.4.3.10. 광조사 시 세포 배양 온도 및 어두운 곳에서의 세포배양 온도

2.4.4. Neutral Red 생존율 시험

2.4.4.1. Neutral Red 처리 배지 조성

2.4.4.2. Neutral Red 배양 기간

- 2.4.4.3. 배양조건(CO_2 농도, 온도, 습도)
- 2.4.4.4. Neutral Red 추출 조건(추출액, 기간)
- 2.4.4.5. Neutral Red 흡광도를 읽는 분광광도기의 파장
- 2.4.4.6. 2 차 파장(참고, 사용한 경우)
- 2.4.4.7. 분광광도기 Blank 내용물(사용한 경우)

2.5. 결과

- 2.5.1. 시험물질의 각 농도에서 세포생존율(용매 대조군에 대한 백분율의 평균값으로 표시)
- 2.5.2. 광조사 유무에 따른 농도-반응 곡선(시험물질 농도에 따른 상대 세포 생존율)
- 2.5.3. 농도-반응 곡선 분석: 가능하면, IC_{50} 계산[$\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$]
- 2.5.4. PIF 또는 MPE 계산을 이용하여 광조사 유무에 따른 농도-반응 곡선 비교
- 2.5.5. 용매 대조군의 시험 허용 기준
- 2.5.6. 절대생존율(광조사 유무에 따른 Neutral Red 추출물의 흡광도)
- 2.5.7. 음성대조군과 용매대조군의 기존 자료(평균, 표준편차)
- 2.5.8. 양성대조군의 시험 허용 기준
- 2.5.9. 양성대조군의 $\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$, PIF/MPE
- 2.5.10. 양성대조군의 기존 자료: $\text{IC}_{50}(+\text{Irr})$, $\text{IC}_{50}(-\text{Irr})$, PIF/MPE, 평균, 표준편차

2.6. 결과의 토의

시험물질이 광독성물질인지에 대한 결론과 함께 결과 값, 용량-반응분석, 통계분석 등에 대한 간단한 의견 등

제46항 피부부식성평가를 위한 생체의 장벽막시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 화학물질의 부식성을 식별하고, UN GHS에 따른 시험물질의 부식성 하위범주(sub-category)를 구분하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 피부 부식성

시험물질의 적용 후 표피에서 진피에 이르는 가시적인 괴사를 동반하는 피부의 비가역적인 손상을 의미

II. 시험

1. 원리

시험계는 시판되는 Corrositex®와 같은 합성 고분자 생체장벽막과 화학물질 검출 시스템 (chemical detection system, CDS)의 두 가지 요소로 구성되어 있다. 본 시험법은 실제 피부에도 같은 기전으로 부식을 유발할 것으로 간주되는, 합성 고분자 생체장벽막의 표면에 시험물질을 도포한 후, 부식성 시험물질에 의한 CDS 장벽막 손상을 감지한다. 장벽막의 침투(또는 투과)는 pH 지시염색약의 색 변화 또는 장벽 아래의 지시액 액성 변화와 같은 다양한 방법이나 CDS에 의해 측정된다.

2. 시험의 준비

2.1 장벽막

- (1) 시판되는 Corrositex®와 같은 장벽막은 단백질의 고분자 수용성 겔과 투과성의 지지막에 해당하는 2 개의 요소로 구성되어 있다. 단백질 겔은 액체와 고체에 불투과성이어야 하나, 부식되거나 투과성으로 바뀔 수 있다. 완전히 구축된 장벽막은 겔의 품질 저하를 일으키는 조건(예: 건조, 미생물의 증식, 흔들림, 균열)을 배제할 수 있는 장소에 보관한다. 허용 가능한 저장 기간을 설정하며, 그 기간이 지난 후에는 사용하지 않는다.
- (2) 투과성의 지지막은 단백질 겔이 겔화되는 과정과 시험물질에 노출되는 동안 기

계적인 지지대로 작용한다. 지지막은 겔이 늘어지거나 움직이는 것을 방지해야 하고, 모든 시험물질을 쉽게 통과시킬 수 있어야 한다.

- (3) 단백질(예: 겔 기반을 형성하는 케라틴, 콜라겐, 단백질 혼합물)로 구성된 단백질 겔은 시험물질의 표적 역할을 한다. 단백질성의 물질은 지지막의 표면에 존재하며, 지시액 위에 장벽막을 놓기 이전에 겔화된다. 단백질 겔은 전체적으로 두께 및 밀도가 균일해야 하고, 기능의 완전성에 영향을 미칠 수 있는 기포나 결함이 없어야 한다.

2.2 화학물질 검출 시스템

- (1) 적합성 검사에 사용되는 것과 동일한 지시액은 시험물질에 반응해야 한다. 시험물질에 반응하여 색이 변하는 pH 지시 염색약 또는 그 조합(예: 크레졸레드와 메틸오렌지)이 사용되어야 한다. 측정 시스템은 광학적이거나 전자적일 수 있다.
- (2) 시험물질이 장벽막을 통과하는 것을 검출하는 검출시스템은 검출하고자 하는 화학물질의 범위 및 그 정량한계를 입증할 수 있도록 적합성 및 신뢰도가 평가되어야 한다.

2.3 대조군

- (1) 시험물질과 함께 용매나 용제를 사용하는 경우에는, 용매나 용제는 장벽막 시스템에 적합해야 한다. 즉, 장벽막 시스템의 완전성에 영향을 주거나, 시험물질의 부식성을 변화시키지 않아야 한다. 가능하면 장벽막 시스템에 대한 용제(또는 용매)의 적합성을 입증하기 위해 용제 대조군을 시험물질과 동시에 시험한다.
- (2) 중등도의 부식성을 갖는 양성(부식성)대조군(예: UN GHS 부식성 하위범주 1B에 해당하는 수산화나트륨 110 mg \pm 15 mg)을 시험물질과 동시에 시험해서 시험계가 적절히 기능하는지 평가한다. 시험물질과 동등한 화학물질 계열의 추가 양성대조군은 부식성 시험물질의 상대적인 부식성을 평가하는데 유용하다. 양성대조군은 투과 시간의 변화를 검출하기 위하여 중등도의 부식성(예: UN GHS 하위범주 1B)을 갖는 것으로 선택한다. 이는 설정된 기준 값보다 허용될 수 없을 정도로 투과 시간이 길거나 짧아서 시험계가 적절히 기능하지 않는 것을 파악하기 위함이다. 이러한 이유로 강부식성(UN GHS 하위범주 1A) 또는 비부식성

의 화학물질은 그 유용성이 제한적이다. 부식성 UN GHS 하위범주 1B 화학물질은 너무 빠르거나 너무 느린 투과 시간의 확인을 가능케 한다. 약 부식성 화학물질(UN GHS 하위범주 1C)은 시험법이 약부식성 및 비부식성의 화학물질을 일관되게 구분할 수 있는지 평가하기 위한 양성대조군으로 이용될 수 있다. 사용된 접근법에 관계없이 양성대조군의 반응 범위는 양성대조군의 투과 시간의 과거 데이터를 바탕으로 허용되는 범위(통상, 평균 $\pm 2 \sim 3 \cdot$ 표준편차)에 근거하여 설정되어야 한다. 각 시험에서 양성대조군의 정확한 투과 시간을 결정하여 허용 범위를 벗어나는 편차를 검출할 수 있어야 한다.

- (3) 음성(비부식성)대조군(예: 10 % 시트르산, 6 % 프로피온산) 또한 장벽막 기능의 완전성을 입증하기 위한 또 다른 하나의 품질관리의 척도로써, 시험물질과 동시에 시험한다.

3. 시험방법

3.1 시험물질의 적합성 검사

- (1) 장벽막 시험을 수행하기에 앞서, CDS를 이용하여 시험물질을 검출할 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 적합성 검사를 수행한다. 시험물질이 CDS에 의해 검출되지 않으면, 장벽막 시험법은 그 시험물질의 부식성을 평가하는데 적합하지 않으며, 다른 시험법을 사용하여야 한다. 적합성 검사에 사용되는 CDS 및 노출 조건은 이후에 수행되는 장벽막 시험의 노출 조건을 반영하여야 한다.

3.2 시험물질의 시간 척도 범주 시험

- (1) 시험법이 적합하다면, 적합성 검사를 통과한 시험물질은 시간척도 범주시험을 수행해야 한다(즉, 약산 및 강산 또는 염기를 구분하기 위한 선별 시험). 예를 들어, 검증된 표준 시험법에서 시간척도 범주시험은 예비산 또는 예비알칼리의 유의한 검출 여부를 바탕으로 어떤 2 개의 시간척도를 사용해야 할지 알아내기 위하여 사용된다. 시험물질의 예비산 또는 예비알칼리에 기반하여 부식성 및 UN GHS 피부 부식성 하위범주를 결정하기 위하여 2 개의 다른 투과 시간 척도를 사용한다.

3.3 시험법 구성요소의 조합과 시험물질의 적용

- (1) 장벽막은 기포가 없으며 지지막이 지시액에 완전히 밀착해 있도록, 지시액이 들

어있는 바이알(또는 시험관) 내에 놓는다. 막의 완전성이 유지되도록 주의를 기울여야 한다.

- (2) 적당한 양의 시험물질(예: 액체 500 μ L 또는 미세분말 고체 500 mg)을 조심스럽게 장벽막의 상층면에 균일하게 도포한다. 각 시험물질 및 그에 대응하는 대조군에 대해 적절한 수의 반복(예: N=4)을 준비한다. 시험물질을 장벽막에 적용한 시간을 기록한다. 짧은 부식 시간이 정확하게 기록되도록, 표본에 대한 시험물질의 적용 시간에 시간차를 둔다.

3.4 장벽막 투과성의 측정

- (1) 각 바이알을 적절히 관찰하여, 지시액에서의 변화(예: 장벽 투과)가 처음으로 발생하는 시간을 기록하고, 적용 후 장벽막을 투과하는데 걸리는 시간을 결정한다.

3.5 시험의 성립조건

- (1) 각각의 UN GHS 부식성 하위범주에 설정된 시간 변수에 따라, 시험물질을 장벽막에 적용한 순간부터 장벽을 투과하기까지 걸리는 시간(분 단위로 표기)을 시험물질의 부식성 예측에 사용한다. 시험이 제대로 작동하기 위해서는 시험물질과 동시에 시험된 양성대조군은 예측된 투과 반응 시간(예: 수산화나트륨이 양성대조군으로 사용된 경우, 8 분 ~ 16 분의 투과 시간)을 보여야 하며, 음성대조군은 부식성을 보이지 않아야 한다. 또한 용매 대조군이 포함되었다면, 부식성이거나 시험물질의 부식성에 영향을 주지 않아야 한다.

3.6 결과의 해석 및 시험물질의 부식성 분류

- (1) 시험물질을 장벽막에 적용한 순간부터 장벽을 투과하기까지 걸리는 시간(분 단위로 표기)을 이용하여 시험물질을 각각의 UN GHS 부식성 하위범주 및 UN 포장등급으로 분류한다. 부식성 하위범주의 3 개 군에 대한 기준 시간 값은 제안된 각 시험법에 따라 설정된다. 기준 시간에 대한 최종적인 결정은 부식위험성이 과소평가될 가능성(예: 위음성)을 최소화한다. 본 시험 지침에 포함된 유일한 시험법으로서, <표 1>에 기술된 Corrositex[®]의 기준 시간 값들을 사용한다.

표 1. Corrositex® 예측 모델

평균 투과 시간(분)		UN GHS 예측 ¹⁾
카테고리 1 시험물질 ²⁾ (분류 시험에 의해 결정됨)	카테고리 2 시험물질 ³⁾ (분류 시험에 의해 결정됨)	
0 분 ~ 3 분	0 분 ~ 3 분	선택적인 부식성 Sub-category 1A
> 3 분에서 60 분	> 3 분에서 30 분	선택적인 부식성 Sub-category 1B
> 60 분에서 240 분	> 30 분에서 60 분	선택적인 부식성 Sub-category 1C
> 240 분	> 60 분	비부식성

1) UN GHS Sub-category 1A, 1B, 1C는 각각 UN 포장등급 I, II, III에 해당한다.

2) 높은 산/알칼리 예비력을 갖는 시험물질

3) 낮은 산/알칼리 예비력을 갖는 시험물질

III. 시험결과 및 보고

1. 시험자료

- 1.1. 시험물질과 양성대조물질을 장벽막에 적용한 순간부터 장벽을 투과하기까지 걸리는 시간(분 단위로 표기)은 각각의 반복 데이터와 각 시험에 대하여 평균 ± 표준편차를 표로 정리하여 보고한다.

2. 시험결과와 보고

시험결과와 보고는 다음 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질 및 대조물질

- (1) 단일조성물질, 화학물질 식별자료(IUPAC 또는 CAS명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드), 구조식, 순도, 적절하고 실질적으로 가능한 불순물의 식별 등(알고 있는 경우).
다중조성물질, UVCB 및 혼합물의 경우 화학물질 식별자료(상기 참조), 조성물의 정량적인 비율, 관련된 물리화학적 특성에 의한 식별
- (2) 물리적 성상, 수용성, 부가적으로 관련된 물리화학적 특성
- (3) (알고 있는 경우) 출처, 로트 번호
- (4) (해당되는 경우) 시험 전의 시험물질/대조물질 처리(예: 가온, 분쇄)
- (5) (알고 있는 경우) 시험물질의 안정성, 사용기한, 재분석일, 저장조건

2.2 용매

- (1) 식별, 사용 농도(해당 되는 경우), 사용량
- (2) 용매 선택에 대한 근거

2.3 입증된 정확도와 신뢰도를 포함한 생체의 장벽막 모델 및 사용된 프로토콜, 시험조건

- (1) 사용된 기구 및 준비 과정에 대한 기술
- (2) 사용된 생체의 장벽막의 공급원 및 조성
- (3) 지시액의 조성 및 색상
- (4) 검출 방법
- (5) 시험물질 및 대조물질의 양
- (6) 반복의 수
- (7) 시간적도 범주시험에 대한 기술 및 근거
- (8) 적용 방법
- (9) 관찰 시간
- (10) 평가 및 적용된 분류 기준에 대한 기술
- (11) 통상적으로 시험법을 수행하기 전에 숙련도 확인 참조물질에 대해 시험을 수행하여 시험법 수행에 대한 숙련도를 입증

2.4 결과

- (1) 도표화된 각 시험과 각 반복에 대한 대조군의 개별 시험 원 데이터
관찰된 기타 효과에 대한 기술
- (2) 예측 모델/결정 기준에 근거하여 결정된 분류

2.5. 결과의 토의

시험물질이 부식성인지에 대한 결론과 함께 결과 값 등에 대한 간단한 의견 등

제47항 소 각막 혼탁도와 투과도(BCOP) 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 도축소에서 적출된 소 각막에 혼탁 유발 및 투과성 증가를 측정함으로써 시험물질의 눈에 대한 유해성을 평가하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 각막혼탁도(Corneal opacity)

시험물질 노출에 의한 각막의 불투명 정도. 각막혼탁도 증가는 각막 손상 정도를 나타냄. 각막혼탁도는 Draize 토끼 눈 시험법처럼 주관적으로 평가하거나, Opacitometer(혼탁도계측기)와 같은 장비를 이용하여 객관적으로 측정 가능

2.2. 각막투과도(Corneal permeability)

각막 상피의 손상을 정량적으로 측정할 수 있는 지표로 각막의 전세포층을 통과하는 플루오레세인나트륨 색소량을 측정함으로써 산출 가능

2.3. 눈자극(Eye irritation)

눈 전면에 시험물질 적용 후 나타나는 눈의 변화로 적용 후 21 일 안에 완전히 회복될 수 있는 것을 의미. “눈에 미치는 가역적 영향” 과 “UN GHS Category 2” 와 같은 의미로 사용됨

2.4. 눈점막자극지수(IVIS, *In Vitro* Irritancy Score)

BCOP (Bovine Corneal Opacity and Permeability) 시험에 사용되는 실험적 공식에 의해 산출된 지수. 각 처리군에서 OP-KIT로 산출된 평균 혼탁도와 평균 투과도 값은 이 공식에 의하여 하나의 생체외 점수로 산출. $IVIS = \text{평균 혼탁도} + (15 \times \text{평균 투과도})$

2.5. LLBO자극지수(LIS, LLBO Irritancy Score)

BCOP 시험 방법에 사용되는 실험적 공식에 의해 산출된 지수. LLBO (Lazer Light Based Opacity)로 산출된 평균 혼탁도와 평균 투과도 값은 이 공식에 의하여 하나의 생체외 점수로 산출. $LIS = lux / 7$ 에서 LLBO의 평균 혼탁도 + (15 x 평균 투과도).

II. 시험

1. 원리

이 시험법은 시험물질에 의한 눈 손상에 따른 각막의 혼탁도와 투과도를 각각 Opacitometer 및 가시광선 분광광도계를 이용하여 정량적으로 측정한다. 혼탁도와 투과도 측정값은 모두 IVIS 또는 LIS를 산출하는 데 사용되며 IVIS 또는 LIS는 시험 물질의 생체내 눈 자극 위험성 예측을 위한 생체외 자극 위험 분류 판정에 사용된다. BCOP OP-KIT 및 LLBO 시험법은 갓 도축된 소(송아지 또는 소)에서 적출한 안구의 각막을 사용한다. 각막 혼탁도는 각막을 투과하는 빛의 양을 측정하여 정량적으로 나타낼 수 있다. 투과도는 각막의 전층을 통과하여 눈의 후방 챔버의 배지에서 발견되는 플루오레세이나트륨 색소의 양을 정량함으로써 측정한다. 시험물질은 각막 홀더의 전방 챔버를 덧붙여 각막의 표피층에 노출시킨다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물종의 선택 소 안구의 출처와 연령

- (1) 식재료에 적합한 건강한 소에서 나온 각막을 BCOP 시험법에 사용한다. 소는 품종, 연령, 성별에 따라 넓은 범위의 체중을 가지므로 도축 시 추천하는 체중은 없다.
- (2) 각막의 지름은 동물의 연령에 따라 다를 수 있다. 생후 8 년 이상된 소의 경우 각막의 수평 기준 지름은 30.5 mm를 초과하고 각막의 중심 두께(CCT, Central Corneal Thickness)는 1100 μm 이상이다. 생후 5 년령 이하인 소의 경우, 수평 기준 지름은 28.5 mm, CCT는 900 μm 미만이다. 이러한 이유로 5 년령이 넘은 소에서 추출된 안구는 일반적으로 사용하지 않는다. 12 월령 미만의 소에서 추출한 안구도 통상적으로 사용하지 않는데 이는 안구가 아직 발달하는 중에 있고 각막의 두께와 지름이 성숙한 소의 안구보다 작다고 보고되어 있기 때문

이다. 그러나 최근에는 어린동물(6개월에서 12개월 이전)의 각막 사용도 허용되고 있는데 이는 가용성 향상, 좁은 연령대 및 소 해면상 뇌증에 대한 잠재적 노출과 관련된 위험 감소와 같은 몇 가지 장점이 있기 때문이다. 부식성 및 자극성 물질에 대한 반응에 있어 각막의 크기와 두께의 영향을 추가적으로 평가하는 것이 유용하다. 실험자는 실험에 사용되는 소의 추정 연령과 체중을 보고한다.

2.2. 소 안구의 적출과 운반

- (1) 안구는 도축장 및 관련기관의 숙련된 작업자에 의해 적출된다. 안구의 기계적 손상과 기타 손상을 최소화하기 위하여 도축 후 최대한 빨리 안구를 적출해야 하며 적출 즉시 냉장으로 보관하여 운송한다. 자극성이 있는 물질이 안구에 노출되는 것을 막기 위하여 도축장의 직원들은 동물의 머리를 세척할 때 가급적 세제를 사용하지 않도록 한다.
- (2) 소 안구는 변질 및(또는) 세균 오염을 최소화하기 위해 적절한 크기의 상자에 들어있는 차가운 HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)에 완전히 담근 채로 실험실로 운반한다. 안구는 도축 과정에 적출되는 것이므로 혈액이나 다른 생물학적 물질(세균 등 다른 미생물) 등에 노출될 수 있다. 따라서 오염의 위험성을 최소화하는 것이 매우 중요하다. 이를 위해 안구를 담은 상자를 얼음박스에 넣고 안구를 보관하는 HBSS에는 100 IU/mL의 페니실린과 100 μ g/mL 스트렙토마이신과 같은 항생제를 첨가한다.
- (3) 안구의 적출과 각막의 사용 시점 사이의 시간 간격을 최소화하며(보통 동일한 날 적출하여 사용한다), 이 간격이 결과에 영향을 미치지 않았다는 사실을 입증한다하도록 한다. 이 결과는 안구의 선택기준 뿐만 아니라 양성 및 음성대조군 반응을 근거로 한다. 하나의 실험에 사용되는 모든 안구는 같은 날 적출한 것을 사용하여야 한다.

2.3. BCOP 시험법에 사용되는 안구의 선별 기준

- (1) 실험실에 안구가 도착하면 혼탁도의 증가 여부, 상처, 신생혈관 등을 주의 깊게 살펴야 하며, 이와 같은 결함이 없는 각막만 사용할 수 있다.

- (2) 각 각막의 품질은 다음의 과정을 통해 평가한다. OP-KIT의 경우, 첫 1 시간의 순응기(Equilibration period, t_0) 후 혼탁도가 7을 초과하는 각막은 제외한다. LLBO의 경우, 시험물질을 처리하기전 레이저 측정 값이 1200 lux 미만 또는 1850 lux 이상인 각막은 폐기한다. (주의: 혼탁도 Unit을 확립하기 위해 사용되는 혼탁도 표준물질로 교정한 Opacitometer를 사용한다.)
- (3) 각 처리군(시험물질, 음성대조군, 양성대조군)은 최소 3 개의 안구로 구성된다. BCOP 시험법에서 음성대조군 각막으로 3 개의 각막을 사용하여야 한다. 모든 각막은 안구에서 분리하여 각막 챔버에 고정되므로, 각각의 각막을 다루는 과정에서 혼탁도와 투과도의 인위적 영향이 발생할 수 있다(음성대조군 포함). 따라서 음성대조군에서 얻은 혼탁도와 투과도 값은 시험물질과 양성대조물질 처리 후 각막의 투과도와 혼탁도의 IVIS/LIS 계산 시 이를 보정하기 위해 사용한다.

2.4. 대조물질

- (1) 각 실험은 음성대조군 혹은 용매대조군과 양성대조군을 포함한다.
- (2) 시험물질이 100 % 액상일 경우 음성대조군(예: 0.9 % 염화나트륨 용액 또는 증류수)을 포함시킨다. 이를 통해 시험계의 비특이적 변화를 감지할 수 있으며, 종말점에서 결과의 기본값(Baseline)을 알 수 있다. 또한 이를 통해 시험 결과 값이 시험조건 이상에 따라 발생된 것이 아니라는 것을 알 수 있다.
- (3) 시험물질이 희석된 액체, 계면활성제 또는 고체 물질의 경우 용매대조군을 포함한다. 이를 통해 시험의 비특이적 변화를 감지할 수 있으며, 결과의 기본값을 알 수 있다. 시험계에 영향을 주지 않는 것으로 입증된 용매만 사용한다.
- (4) 이미 알려진 자극물질들을 양성대조군으로 사용함으로써 적절한 반응의 유도과 시험계의 완전성을 확인할 수 있다. 양성 대조물질의 자극 정도는 적용 시간에 따라 나타나는 반응의 차이를 가늠할 수 있는 정도가 적절하며 이를 넘어선 지나친 자극을 나타내는 경우 양성대조물질로 사용하기에 적합하지 않다.
- (5) 액상 시험물질의 양성대조물질로는 100 % 에탄올 또는 100 % 디메틸포름아마이드(Dimethylformamide)를 사용한다. 고체 시험물질의 양성대조군으로는 0.9

% 염화나트륨용액(Sodium chloride solution)에 녹인 20 % w/v 이미다졸(Imidazole)을 사용한다.

- (6) 특정 화학물질이나 제품군의 잘 알려지지 않은 물질에 대한 눈의 자극성을 평가하거나, 특정 자극 범위에서의 상대적인 안자극성을 평가할 때에는 기준 참조물질이 유용하다.

3. 시험방법

3.1. 각막 준비

- (1) 손상되지 않은 것으로 확인된 각막에 대해 공막을 약 2 mm ~ 3 mm 정도 포함하여 상피와 내피가 손상되지 않도록 주의하여 자른다. 추출된 각막을 전방 홀더에는 각막의 상피가, 후방홀더에는 각막의 내피가 위치하도록 각막홀더에 장착한다. 홀더의 전방 및 후방 양쪽 챔버에 미리 데워진 페놀레드 미함유 EMEM(Eagle's Minimum Essential Medium) 배지를 거품이 생기지 않도록 주의하면서 후방 챔버부터 가득 채운다. 각막이 배지에 적응하여 정상 대사 활동을 할 수 있도록 이 홀더를 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 최소 1 시간(t_0) 동안 배양한다(생체내에서 각막 표면은 대략 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이다).
- (2) 순응기 이후, 미리 $32\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 맞춰진 페놀레드 미함유 신선한 EMEM 배지를 양쪽 챔버에 채워 각 각막마다 혼탁도의 기본 값을 측정한다. 육안적 조직 손상(굽힘, 색소침착, 신생혈관형성)이나 혼탁도 7 또는 이에 해당하는 Opacimeter 값을 초과하는 경우(OP-KIT) 또는 1200 lux 미만이거나 1850 lux 이상인 경우(LLBO)의 각막과 사용한 각막홀더는 폐기한다. 최소 3 개의 각막을 음성(또는 용매) 대조군 각막으로 선택한다. 남은 각막들을 처리군과 양성대조군으로 사용한다.
- (3) 물은 공기보다 열용량이 크기 때문에, 배양에 필요한 온도를 더 안정적으로 제공한다. 따라서 각막홀더의 온도 유지를 위해 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지된 항온수조를 사용하는 것이 권고된다. 그러나 공기 배양기도 사용가능하며 이 때 안정적 온도를 유지하도록 주의한다(예를 들어 미리 홀더 및 배지의 온도를 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 조정).

3.2. 시험 물질의 적용

- (1) 2 개의 다른 물질이 시험방법에 적용되는데 즉, 하나는 액체 및 계면활성제(고체 또는 액체)이고 다른 하나는 계면활성제가 아닌 고체물질이다.
- (2) 액체는 희석하지 않고 사용한다. 반고체, 크림, 왁스는 일반적으로 액체와 동일하게 시험한다. 계면활성제물질은 0.9 % 염화나트륨용액이나 증류수 또는 시험계에 영향을 미치지 않는 것으로 확인된 기타 용매에 10 % w/v 농도로 희석하여 적용한다. 계면활성제를 포함하는 혼합물은 희석하지 않거나 인체의 적절한 노출 시나리오에 따라 적당한 농도로 희석하여 적용한다. 적용시간은 10 분으로 한다. 희석농도를 다르게 하거나 적용 시간을 다르게 할 경우 충분한 과학적 근거를 확보하여야 한다.
- (3) 계면활성제가 아닌 고체물질은 일반적으로 0.9 % 염화나트륨용액이나 증류수 혹은 시험계에 영향을 미치지 않는 기타 용매에 20 % w/v 농도로 희석한 용액이나 현탁액 상태로 적용한다. 과학적 타당성이 있는 경우 고체는 개방형 챔버법을 사용하여 직접 적용할 수 있다. 적용시간은 고체의 경우 4 시간이며 적용시간을 달리할 경우 이에 대한 충분한 과학적 근거가 있어야 한다.
- (4) 시험물질의 물리 화학적 특성(예: 고체, 액체, 점액성 대비 비 점액성 액체)에 따라 다른 처리방법을 사용한다. 이 선택에 있어서 가장 중요한 고려사항은 시험 물질이 충분히 상피 표면 전체에 적용될 수 있는지 여부와 세척 과정에서 시험물질이 완전하게 제거될 수 있는지 여부이다. 폐쇄형 챔버 방식은 일반적으로 점성이 없거나 약간 점성이 있는 액상 물질 적용 시 사용하며 개방형 챔버 방식은 일반적으로 반점성이나 점성이 있는 액체와 고체 물질 적용 시 사용한다.
- (5) 폐쇄형 챔버법에서는 전방 챔버의 상단 표면의 구멍을 통해 각막 상피층으로 충분한 양(약 750 μ L)의 시험물질이 투여되고, 적용시간동안 구멍은 마개를 이용하여 막아둔다. 시험물질이 각 각막에 규정된 시간만큼 충분하게 적용되어야 한다.
- (6) 개방형 챔버법을 사용 시, 시험 전에 전방 챔버의 잠금쇠 링과 유리막을 제거한다. 마이크로피펫을 이용하여 대조물질이나 시험물질(750 μ L, 또는 각막을 덮을 수 있는 충분한 양)을 각막 상피 표면에 직접 적용한다. 마이크로피펫으

로 적용이 어려운 물질의 경우, 양변위 피펫(Positive displacement pipet)으로 적용할 수 있다. 양변위 피펫의 피펫 팁을 주사기의 디스펜싱 팁에 삽입함으로써 물질이 압력 하에 양변위 피펫 팁에 채워질 수 있도록 한다. 동시에 주사기 플런저가 눌리고 피펫 피스톤이 위로 끌어당겨진다. 만약 피펫 팁에 공기 방울이 생긴다면 시험물질을 제거 또는 배출하고 팁이 공기 방울 없이 물질로 채워질 때까지 이 과정을 반복한다. 필요하다면, 시험물질의 정확한 부피 측정 및 각막 상피 표면 적용이 수월한 주사기(주사바늘을 제거한)를 사용할 수 있다. 적용 후, 유리막을 전방 챔버로 대체하여 폐쇄된 시험계로 재구성한다.

3.3. 노출 후 배양

- (1) 노출 후, 시험물질, 음성대조물질 또는 양성대조물질을 전방 챔버에서 제거하고, 각막 상피를 최소 3 번(또는 육안으로 적용물질이 관찰되지 않을 때까지) 페놀레드가 포함된 EMEM 배지로 세척한다. 이는 페놀레드의 색 변화로 산성 또는 염기성 물질 제거 여부를 알 수 있기 때문이다. 페놀레드의 색깔이 노란색 또는 보라색으로 변하거나, 적용 물질이 여전히 보인다면 각막을 3 번 이상 세척한다. 적용물질이 배지에 남아있지 않다고 판단되면 마지막으로 페놀레드 미함유 EMEM 배지로 각막을 세척한다. 페놀레드 미함유 EMEM 배지는 혼탁도 측정 전에 전방 챔버의 페놀레드를 제거하기 위해 마지막 세척과정에 사용된다. 마지막 세척 후 전방 챔버를 페놀레드 미함유 EMEM 배지로 다시 채운다.
- (2) 액체나 계면활성제의 경우 세척 후 각막을 2 시간 동안 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 추가 배양한다. 경우에 따라서는 배양시간이 더 길수록 유익할 수 있으므로 상황에 따라 적절한 시간동안 배양한다. 고체를 적용한 각막은 4 시간 적용 후 완전히 세척한 후 추가 배양은 필요하지 않다.
- (3) 액체나 계면활성제는 노출-후 배양 후, 계면활성제가 아닌 고체는 4 시간 적용 후에 각 각막의 혼탁도와 투과도를 기록한다. 또한, 각 각막을 육안적으로 관찰하고 관찰 사항을 기록한다(예: 조직의 박리, 잔여 시험물질, 균질하지 않은 혼탁도). 이런 관찰사항은 Opacitometer의 측정값에 영향을 줄 수 있기 때문에 중요하다.

3.4. 종말점 측정

- (1) 혼탁도는 각막을 통과하는 빛의 양으로 결정된다. 각막 혼탁도는 Opacitometer로 정량적으로 측정하며 혼탁도 값은 연속형 척도로 측정한다.
- (2) 투과도는 플루오레세이나트륨 색소가 각막 전세포층(즉 각막 바깥 표면의 상피부터 각막 안쪽 표면의 내피까지)을 통과하는 양으로 측정된다. 시험물질이 액체 또는 계면활성제인 경우에는 4 mg/mL의 플루오레세이나트륨액을 1 mL를, 계면활성제가 아닌 고체물질인 경우에는 5 mg/mL의 플루오레세이나트륨액 1 mL를 각막 상피와 밀착해 있는 전방 챔버에 넣고, 각막 내피와 밀착해 있는 후방 챔버는 새로운 EMEM 배지로 채운다. 홀더를 수평하게 놓고 90 분 ± 5 분 동안 32 °C ± 1 °C에서 배양한다. 배양 후 후방 챔버로 이동한 플루오레세이나트륨의 양을 자외/가시부 분광광도계로 정량적으로 측정한다. 측정파장은 490 nm 이며 연속형 척도인 흡광도(OD₄₉₀) 값으로 나타낸다. 플루오레세인 투과도 값은 가시광 분광광도계로 측정한 증장 1 cm의 OD₄₉₀으로 나타낸다.
- (3) 다음의 경우에 96-웰 마이크로티터 플레이트 리더기(96-well microtiter plate reader)로 대체해서 사용할 수 있다; (i) 플레이트 리더기의 흡광도 측정의 선형성 범위를 설정할 수 있어야 하며, (ii) 증장 1 cm 값에 상응한 OD₄₉₀ 값을 얻기 위해 플루오레세인 샘플을 정확한 부피로 웰을 가득(약 360 μL) 채워야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 혼탁도와 투과도 OD₄₉₀ 값을 공시험의 혼탁도와 음성대조군 투과도로 보정한 다음 평균 혼탁도와 투과도(OD₄₉₀)를 다음 식에 대입하여 눈점막자극지수(IVIS)와 LLBO자극지수(LIS)를 산출한다.

$$\text{IVIS(In Vitro Irritancy Score)} = \text{평균 혼탁도(판독된 OP-KIT)} + (15 \times \text{평균 투과도 OD}_{490})$$

$$\text{LIS} = \text{평균 혼탁도(lux/7에서 LLBO 판독 값)} + (15 \times \text{평균 투과도 OD}_{490})$$

1.2. 시험물질이 부식 유발여부 또는 심각한 자극을 유발하는지 알아보기 위해 혼탁도와 투과도를 개별적으로 평가한다(판정 기준 참고).

2. 판정 기준

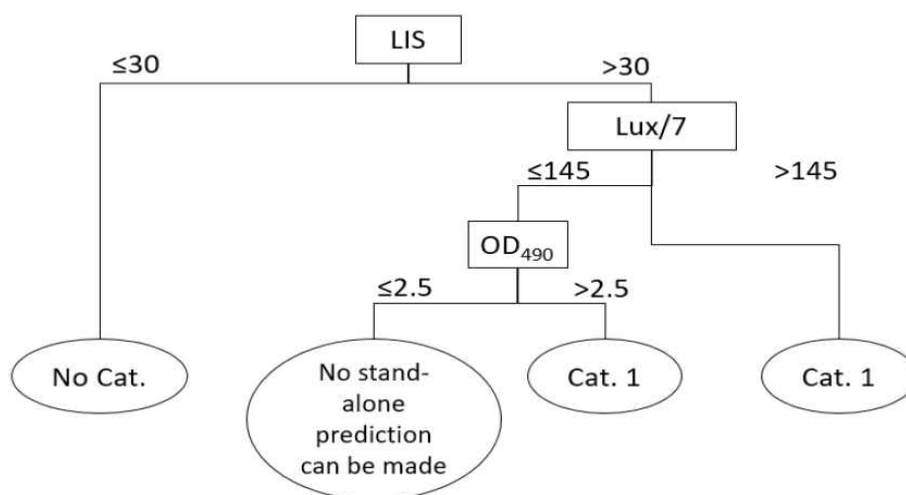
2.1. 심한 눈 손상을 유도하는 물질(UN GHS 카테고리 1)과 눈 자극 또는 심한 눈 손상 대한 분류가 필요치 않은 물질(UN GHS No Category)을 식별할 때의 기준치는 다음과 같다:

Opacitometer 1 OP-KIT* and Duratec	Opacitometer 2 LLBO**	UN GHS
$IVIS \leq 3$	$LIS \leq 30$	No Category (눈 자극 또는 심한 눈 손상 대한 분류가 필요치 않은 물질)
$3 < IVIS \leq 55$	$LIS > 30$ 이고 $lux/7 \leq 145$ 이며 $OD_{490} \leq 2.5$ 인 경우	No stand-alone prediction can be made (판정 보류)
$IVIS > 55$	1) $LIS > 30$ 이고 $lux/7 \leq 145$ 이며 $OD_{490} > 2.5$ 인 경우 또는 2) $LIS > 30$ 이고 $lux/7 > 145$ 인 경우	카테고리 1 (심한 눈 손상을 유도하는 물질)

* 113 개의 물질과 100 개의 혼합물을 포함하는 ICCVAM 데이터베이스 기반

** 145 가지 물질에 대한 LLBO 평가 연구에 근거

Figure 1: Prediction model for BCOP LLBO test method



3. 시험의 성립조건

3.1. OP-KIT 시험의 경우 양성대조군의 IVIS값이 기존의 IVIS 누적치(3 개월 마다) 평균값의 표준편차 2 배수 범위 안에 있을 때, LLBO 시험의 경우, 양성대조군의 LIS 값이 기존의 LIS 누적치(3 개월마다) 평균 값의 표준편차 2 배수 범위 안에 있을 때 시험은 성립한다. 또한 시험을 자주 하지 않는 실험실(예: 월 1 회 이하)의 경우 매회 판정 시험을 실시한다. 음성대조군 또는 용매/용제대조군의 반응으로 얻은 혼탁도 및 투과도 값은 음성대조물질 또는 용매/용제를 소의 각막에 처리하여 얻어진 혼탁도와 투과도 누적치의 상한 값보다 작아야 한다. 결과 분류가 명확할 땐 최소 3 개 이상의 각막을 사용한 하나의 시험으로 충분하다. 하지만 첫 시험에서 결과가 불명확한 경우 두 번째 시험 시행을 고려하며(그러나 필수적이지는 않음), 또한 첫 시험과 두 번째 시험의 평균 IVIS 결과 값이 일치하지 않은 경우에는 세 번째 시험을 고려한다.

3.2. 이런 맥락에서 만약 다음과 같이 3 개의 각막으로 예측한 판정 결과가 서로 일치하지 않은 경우 첫 시험에서의 결과가 불명확하다고 판단한다.

- 3 개 각막 중 2 개의 판정결과가 3 개 각막의 평균 값으로 부터의 판정한 결과와 일치하지 않은 경우, 또는
- 3 개 각막 중 1 개의 판정결과가 3 개 각막의 평균 값으로 부터의 판정한 결과와 일치하지 않은 경우, 그리고 결과 값이 아래와 같이 나온 경우
 - OP-KIT의 경우 기준 값인 55보다 IVIS 값이 10을 초과한 경우
 - LLBO의 경우 Lux/7 평균 혼탁도가 145를 초과하여 UN GHS Category 1로 판정되었으나 3 개 중 1 개의 혼탁도가 130 미만인 경우
 - LLBO의 경우 OD 평균 값이 2.5를 초과하여 UN GHS Category 1로 판정되었으나 3 개 중 1개의 OD 값이 2.0 미만인 경우
 - LLBO의 경우 LIS 평균 값이 30 이하이므로 UN GHS No Category로 판정받았으나 3 개중 1 개의 LIS 값이 40을 초과하는 경우

- 만약 반복 시험 시행 결과가 첫 시험의 예측 결과를 입증한다면, 추가 시험 없이 최종 판정을 할 수 있다. 만약 반복 시험이 첫 시험 결과와 일치하지 않는다면, 불분명한 판정을 피하고 시험물질의 부식성을 분류하기 위해 세 번째와 최종 시험을 진행해야 한다. 3 개 중 어떤 시험이라도 UN GHS 카테고리 1로 판정하는 시험 결과의 경우 분류 및 표시를 위한 추가 시험을 하지 않아도 된다.

4. 시험결과의 보고

시험의 보고는 다음 정보를 포함한다.

4.1. 시험물질과 대조물질

- (1) 단일조성물질: IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드와 같은 화학물질 식별 정보, 구조식
- (2) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질: 가능한 한 성분의 화학적 특성, 순도, 함량 및 관련있는 물리·화학적 성질
- (3) 물성, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류 및 물리화학적 특성
- (4) 순도, 화학물질 식별정보(적절하고 실질적으로 가능한)
- (5) 시험 전처리(예: 가온, 분쇄)
- (6) 보관조건 및 안정성

4.2. 시험의뢰자와 시험 기관 정보

- (1) 시험의뢰자의 이름과 주소
- (2) 시험 기관과 시험 책임자

4.3. 시험조건

- (1) 사용한 Opacitometer(예: 모델 및 사양)과 기계 설정
- (2) 측정법의 직선성을 보여주는 혼탁도와 투과도 측정 장치
(Opacitometer과 분광광도계)의 검·교정 정보

- (3) 각막 홀더의 종류(모델 및 사양)
- (4) 사용한 기계 설명서
- (5) 시험법의 완전성(정확성 및 신뢰성)을 확인하기 위해 사용된 방법(예: 주기적으로 숙련도 물질을 사용하여 시험)

4.4. 성립조건

- (1) 양성 및 음성대조군 시험 결과값이 누적된 기존 자료 결과값 범위 내 해당여부
- (2) 가능하다면, 기준물질 시험 결과값이 누적된 기존 자료 결과값 범위 내 해당여부

4.5. 소 안구 적출 및 준비

- (1) 소 안구 출처 증명(예: 적출 시설)
- (2) 소 안구의 저장 및 운송 상태(예: 안구 적출 날짜와 시간, 안구 적출과 실험 시작 전 시간 간격, 운송 배지와 온도, 사용된 항생제)
- (3) 소 각막의 준비 및 설치
(각막의 질, 각막 직경에 대한 각막 홀더의 적합성, 온도 및 각막 선택 기준에 대한 설명 포함)

4.6. 시험 방법

- (1) 사용된 반복 수
- (2) 음성 및 양성대조군에 대한 자료(가능한 경우 용매대조군 및 기준물질 포함)
- (3) 시험 물질 농도, 적용, 노출 시간 및 노출-후 배양 시간
- (4) 평가 및 결정 기준에 대한 설명
- (5) 시험의 성립조건에 대한 설명
- (6) 시험 방법을 수정했을 경우 이에 대한 설명
- (7) 결정 기준에 대한 설명

4.7. 결과

- (1) 각 군별 도출 결과값을 도표화(예: 시험물질과 양성 및 음성대조군, 기준물질의

혼탁도와 OD₄₉₀ 및 산출된 IVIS 또는 LIS 값, 반복 실험 결과와 각 실험의 평균 ± 표준편차)

(2) 각막 염색을 포함한 관찰된 다른 결과의 영향에 대한 설명

(3) 생체의 UN GHS 분류 결과

4.8. 결과의 토의

4.9. 결론

부록 1

BCOP 시험 숙련도 물질

이 시험방법을 일상적으로 사용하기 전에 먼저 해당 실험실은 표1에서 추천하는 13 종의 숙련도 확인 시험물질을 사용하여 안구 위험 등급을 정확하게 식별하는 기술적 능력을 입증해야 한다.

표 1 : BCOP 시험의 숙련도 확인을 위한 물질

화학물질	CAS 번호	화학 등급	물리적 상태	생체 내 분류	BCOP 분류
Benzalkonium chloride (5%)	8001-54-5	Onium compound	액체	Category 1	Category 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, Amidine	고체	Category 1	Category 1
Benzoic acid	65-85-0	Carboxylic acid	고체	Category 1	Category 1
Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	고체	Category 1	Category 1
Trichloroacetic acid (30%)	76-03-9	Carboxylic acid	액체	Category 1	Category 1
2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	액체	Category 2A	No stand-alone prediction can be made
Ethyl-2-methylacetoacetate	609-14-3	Ketone, Ester	액체	Category 2B	No stand-alone prediction can be made
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	고체	Category 2	No stand-alone prediction can be made
EDTA, di-potassium salt	25102-12-9	Amine, Carboxylic acid (salt)	고체	Not Classified	Not Classified
Tween 20	9005-64-5	Ester, Polyether	액체	Not Classified	Not Classified
2-Mercaptopyrimidine	1450-85-7	Acyl halide	고체	Not Classified	Not Classified
Phenylbutazone	50-33-9	Heterocyclic	고체	Not Classified	Not Classified
Polyoxyethylene 23 laurylether (BRIJ-35) (10%)	9002-92-0	Alcohol	액체	Not Classified	Not Classified

제48항 닭 적출 안구(ICE)를 이용한 눈 자극시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 적출된 닭의 안구를 이용하여 시험물질의 독성 유발 정도를 측정함으로써 안구에 유해할 수 있는 시험물질을 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 각막혼탁도(Corneal opacity)

시험물질에 의한 각막의 불투명 정도. 각막 혼탁도 증가는 각막 손상 정도를 나타냄

2.2. 각막투과도(Corneal swelling)

ICE (Isolated Chicken Eye) 시험법에서 시험물질에 노출된 후 각막의 팽창의 정도를 측정하는 객관적 척도. 기저치(처리 전)의 각막 두께와 ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 일정한 시간 간격에서 측정한 각막 두께의 백분율로써 나타냄. 각막 종창(부종)의 정도는 각막 손상의 지표임

2.3. 눈자극(Eye irritation)

눈 전면에 시험물질을 적용한 후 나타나는 눈의 변화로서 적용 후 21 일 안에 완전히 회복될 수 있는 것. ‘눈에 미치는 가역적 영향’ 과 ‘UN GHS Category 2’ 와 같은 의미로 사용함

2.4. 플루오레세인 잔류도(Fluorescein retention)

ICE 시험법에서 시험물질에 노출된 후 각막의 상피세포에 남아 있는 플루오레세인 나트륨의 양. 플루오레세인 잔류의 정도는 각막 상피 손상의 지표

II. 시험

1. 원리

이 시험법의 기본원리는 시험물질에 의한 눈 손상을 각막 종창(부종), 혼탁도, 그리고 플루오레세인 잔류도로써 측정한다.

2. 시험의 준비

2.1. 닭 안구의 공급처 및 주령

- (1) 보통 닭의 안구는 사람의 식용을 목적으로 하는 양계장에서 수집한다. 식용에 적합한 건강한 닭의 안구만을 사용한다.
- (2) 시험 사용에 적당한 닭의 주령을 평가한 연구는 없지만, 전통적으로 이 시험법에 이용되는 닭의 주령과 체중은 도계장에서 주로 취급하는 영계(예: 약 7 주령, 1.5 kg ~ 2.5 kg)에 해당한다.

2.2. 안구의 적출과 운반

- (1) 닭을 인도적으로 기절시킨 후, 목을 절개하여 방혈 후 머리를 신속히 분리한다. 닭의 머리를 신속하게 운반하여 세균감염과 조직파괴를 최소화하기 위해 닭 공급처는 실험실에서 가까워야 한다. 시험의 허용기준에 맞추기 위해서는 닭 머리를 수집하고 안구를 적출하여 관류장치에 넣을 때까지의 시간을 최소화(일반적으로 2 시간 이내) 한다. 시험에 사용된 모든 닭의 안구는 도축일자가 동일해야 하고, 동일한 군집에서 수집한다.
- (2) 안구는 실험실에서 적출하기 때문에, 도계장에서 생리식염수로 적신 화장지로 습도를 조절한 플라스틱 상자에 머리를 담고 상온(일반적으로 18 °C ~ 25 °C 사이)에서 운반한다.

2.3. ICE 시험법에 사용되는 안구의 선별 기준과 수

- (1) 적출한 후 무처리 조건에서도 높은 플루오레세인 염색(예: > 0.5) 또는 각막 혼탁도 점수(예: > 0.5)를 보이는 안구는 제외한다.
- (2) 시험물질처리군과 양성대조군은 각각 최소 3 개 이상의 안구를 사용한다. 음성대조군 또는 용매대조군(생리식염수 이외의 용매를 사용할 경우)은 최소한 1 개 이상의 안구를 사용한다.

- (3) GHS NC(Non-classified) (비자극)의 판정이 된 고체물질의 경우는 안구 3 개를 사용하여 2 차 추가 시험을 하여 음성의 결과를 확정하거나 폐기할 것을 추천한다.

2.4. 대조 물질

- (1) 각 실험마다 음성 또는 용매대조군과 양성대조군을 둔다.
- (2) 원액 또는 고체를 시험하는 경우에는, 시험 시스템의 비특이적 변화를 탐지하고 부적절하게 자극 반응을 일으키지 않도록 ICE 시험법에서 생리식염수를 음성대조군으로 사용한다.
- (3) 희석한 액체를 시험하는 경우에는, 시험 시스템의 비특이적 변화를 탐지하고 부적절하게 자극 반응을 일으키지 않도록 용매대조군을 포함시킨다. 시험 시스템에 대하여 유해효과가 없다는 것이 확실히 증명된 용매만 이용할 수 있다.
- (4) 각 실험에 확인된 눈 자극 물질을 양성대조군으로 포함시켜 적절한 반응이 유도되었음을 입증한다. 이 시험법에서 이용하는 ICE 시험법은 눈 부식성 물질 또는 심한 눈 자극 물질을 식별하는 것이므로, 양성대조군은 심한 반응을 유발하는 UN GHS Category 1로 분류기준을 충족시키는 표준물질이어야 한다. 그러나 시간 경과에 따른 양성대조반응의 변동성을 평가하려면 반응의 정도가 너무 강하지 않아야 한다. 충분한 양성대조군의 생체외 자료를 확보하여 양성대조군에 대한 통계적으로 허용 가능한 범위를 계산해 낼 수 있어야 한다. 만약 특정 양성대조군에 대한 적절한 ICE 시험법의 기존 자료가 없으면, 이 정보를 얻기 위한 시험을 수행한다.
- (5) 액체 시험물질에 대한 양성대조물질의 예는 10 % 초산 또는 5 % 염화벤잘코늄이며, 고체 시험물질에 대한 양성대조물질의 예는 수산화나트륨 또는 이미다졸이다.
- (6) 기준물질은 특정 화학물질 또는 제품 분류에 속하는 미지 화학물질의 눈 자극성을 평가하거나, 자극반응의 특정한 범위 내에서 눈 자극 물질의 상대적인 눈 자극성을 평가하는데 유용하다.

3. 시험방법

3.1. 안구의 준비

- (1) 각막에 손상을 가하지 않도록 주의하며 눈꺼풀을 잘라낸다. 각막의 완전성을 평가하기 위해 2 % w/v 플루오레세인나트륨 1 방울을 각막 표면에 적용하고, 수 초 후에 생리식염수로 씻어낸다. 각막 손상 여부를 확인하기 위해 플루오레세인으로 처리한 안구를 세극등현미경(Slit-lamp microscope)으로 관찰한다(예: 플루오레세인 잔류도 및 각막 혼탁도 ≤ 0.5).
- (2) 각막이 손상되지 않은 경우에는 손상에 주의하며 안구를 두개골로부터 분리한다. 수술 집게로 순막(Nictitating membrane)을 단단히 잡고 안구를 안와로부터 잡아당긴다. 안구의 근육은 끝이 무딘 굽은 수술용 가위로 잘라낸다. 과도한 압력(예: 압축가공물)으로 인하여 각막이 손상 되어 시험 결과의 오류를 일으키는 것을 피하는 것이 중요하다.
- (3) 안구를 안와로부터 적출할 때, 육안으로 확인할 수 있는 시신경 일부가 남아 있어야 한다. 적출한 안구를 흡수패드에 올려놓고 순막과 기타 결합조직을 잘라내어 제거한다.
- (4) 적출한 안구를 스테인리스 스틸 또는 적절한 클램프에 의해 눈에 너무 많은 압력이 가해지지 않도록 하며, 각막이 수직이 되도록 위치시킨다. 그 다음 클램프를 관류장치의 챔버에 옮긴다. 이 때 각막 전체가 생리식염수에 (3 방울 ~ 4 방울/분 또는 0.1 mL/분 ~ 0.15 mL/분) 적셔질 수 있도록 위치를 조정해야 한다. 관류장치의 챔버 온도는 $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 유지한다.
- (5) 관류장치에 위치시킨 후에 세극등현미경으로 안구를 다시 검사하여 적출과정 중에 손상을 입지 않았음을 확인한다. 이 때 세극등현미경(예: Haag-Streit BP900)에 장착된 깊이 측정기로 각막 꼭지점에서 각막의 두께를 측정한다. 안구가 (i) 플루오레세인 잔류도 > 0.5 , (ii) 각막 혼탁도 > 0.5 , 또는 (iii) 추가적인 손상의 징후가 있을 경우에는 교체한다. 이 기준에서 제외되지 않았더라도 각막의 두께가 전체 집단의 평균값에서 10 % 이상 벗어나는 안구는 제외한다. 실험자는 세극등현미경의 세극광의 폭 조정 설정이 다르면 각막의 두께가 다르게 측정될 수 있다는 것을 명심해야 한다.

- (6) 검사를 통과한 안구에 시험물질을 적용하기에 앞서 약 45 분 ~ 60 분 동안 시험계에서 평형을 이룰 때까지 안정화시킨다. 그 다음 각막 두께와 혼탁도를 측정하여 영점측정기준에서의 기본 값을 정한다 (예: 시간=0). 적출과정에서 측정된 플루오레세인 잔류도를 해당 평가항목의 기본 값으로 사용한다.

3.2. 시험 물질의 적용

- (1) 영점측정기준에서의 기본값을 정한 직후, 홀더에 든 안구를 관류장치에서 꺼내 수평으로 놓은 다음 각막에 시험물질을 적용한다.
- (2) 일반적으로 액체 시험물질은 희석시키지 않은 채로 사용하지만, 필요(예: 시험설계의 일환)에 따라 희석시킬 수 있다. 시험물질을 희석시키는 데에 선호되는 용매는 생리식염수이다. 그러나 통제된 조건 하에서 생리식염수 외의 다른 용매를 사용할 수 있으나, 이에 대한 적합성을 입증해야 한다.
- (3) 각막 전체 표면을 고르게 덮기 위해 액체 시험물질을 적용한다. 표준 용량은 0.03 mL이다.
- (4) 고체 시험물질은 유발과 유봉, 또는 이와 유사한 분쇄 도구를 이용하여 가능한 곱게 갈아서 사용한다. 고체 시험물질의 가루를 각막 전체 표면에 고르게 덮을 수 있도록 적용한다. 표준 중량은 0.03 g이다.
- (5) 상온에서 액체 또는 고체 시험물질을 10 초 동안 적용하고 약 20 mL의 생리식염수로 씻어낸다. 안구를 클램프로 잡은 채로 다시 관류장치로 옮겨서 수직으로 위치시킨다. 필요시, 시험물질 도포 10 초 후 및 다음 시험시점에서(예: 각막에서 시험물질의 잔재가 발견될 경우) 추가로 세척을 할 수도 있다. 일반적으로 추가적인 세척에 사용하는 생리식염수의 양은 중요하지 않지만, 화학물질이 각막에 붙어있는지 관찰하는 것은 중요하다.

3.4. 평가항목 측정

- (1) 각막은 시험물질 처치 전 및 처치/세척 후 30 분, 75 분, 120 분, 180 분 그리고 240 분(± 5 분)에 평가한다. 4 시간에 걸친 관찰 과정 동안 각막을 적절히 측정할 수 있으며 각 측정 시점 간에 충분한 시간 간격을 두어 처리된 모든 안구들에 대해 필요한 관찰을 수행한다.

- (2) 평가항목은 각막 혼탁도, 종창, 플루오레세인 잔류도, 그리고 형태학적인 변화(예: 상피 함몰 또는 혈거위짐)이다. 플루오레세인 잔류도(시험물질 처리 전, 시험물질 노출 후 30 분이 지난 시점에만 측정)를 제외한 모든 평가항목은 위에서 언급된 시점에 측정한다.
- (3) 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도, 형태학적인 변화, 그리고 조직병리학적 검사가 수행된 경우에 기록을 위해 사진을 찍어두는 것을 권장한다.
- (4) 4 시간째 마지막 검사를 시행한 후에, 안구를 적절한 고정액(예: 중성 완충 포르말린)에 보존하여 향후 있을지 모르는 조직병리학적 검사에 대비하는 것을 권고한다.
- (5) 각막의 종창(부종)은 세극등현미경의 각막두께측정기로 켄 각막 두께로부터 산출한다. 각막의 종창(부종)은 아래의 공식에 따라 각막 두께 측정값에서 산출되어 백분율로 나타낸다.

$$\left(\frac{\text{시간 } t \text{에서의 각막의 두께} - \text{시간 } 0 \text{에서의 각막의 두께}}{\text{시간 } 0 \text{에서의 각막의 두께}} \right) \times 100$$

- (6) 모든 관찰 시점에서 시험한 모든 안구들의 각막 종창(부종)의 평균백분율을 측정한다. 측정된 시점과 관계없이 각막 종창(부종)의 최고 평균점수에 근거하여 각각의 시험물질에 대한 ICE 등급이 매겨진다.
- (7) 각막 혼탁도는 가장 혼탁한 각막 부위를 측정하여 표 1을 바탕으로 점수를 산출한다. 모든 관찰 시점에서 시험한 모든 안구들의 평균 각막 혼탁도를 계산한다. 측정된 시점과 관계없이 각막 혼탁도의 최고 평균점수에 근거하여 각각의 시험물질에 대한 ICE 등급이 매겨진다.

표 1. 각막 혼탁도 점수

점수	관찰내용
0	혼탁 없음
0.5	매우 약한 혼탁이 있음
1	산재 또는 넓은 부위의 혼탁이 있으나 홍채의 세부는 명확하게 관찰됨
2	쉽게 확인할 수 있는 투명한 구역; 홍채의 세부가 약간 흐릿해짐
3	심한 각막의 혼탁; 홍채의 세부는 보이지 않으나 동공 크기는 겨우 판별가능
4	각막이 완전하게 혼탁되고; 홍채를 구분할 수 없음

- (8) 플루오레세인 잔류도는 표 2를 바탕으로 30 분에서 관찰한 값만을 측정한다. 모든 안구의 평균 플루오레세인 잔류도를 계산하고 이를 기반으로 각 시험물질에 대한 ICE 등급이 매겨진다.

표 2. 플루오레세인 잔류도 점수

점수	관찰내용
0	플루오레세인 잔류 없음
0.5	매우 약한 단일 세포 염색
1	단일 세포 염색이 처리한 각막 전체 부위에 산재
2	국소 또는 융합성의 짙은 단일 세포 염색
3	융합된 넓은 부위의 각막에 플루오레세인이 잔류

- (9) 형태적 영향에는 각막 상피세포의 “함몰(Pitting)”, 상피 “헐거워짐(Loosening)”, 각막 표면의 “거칠어짐(Roughening)”, 시험물질이 각막에 “접착(Sticking)” 하는 정도가 포함된다. 이 결과들은 그 강도가 다를 수 있으며, 동시에 나타날 수 있다. 결과의 분류는 시험자의 해석에 따라 주관적이다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

- 1.1. 각막 혼탁도, 종창, 플루오레세인 잔류도 결과를 개별적으로 평가하여 각 평가항목에 대한 ICE 분류를 도출한다. 각 평가항목에 대한 ICE 분류를 취합하여 각 시험물질에 대한 자극성을 분류한다(판정 기준 참고).

2. 판정 기준

- 2.1. 각 평가항목이 측정되면, 미리 마련된 기준에 근거하여 ICE 분류를 한다. 각막 종창(표 3), 혼탁도(표 4), 플루오레세인 잔류도(표 5)의 분류체계를 아래와 같이 4 개의 ICE 분류를 사용하여 평가한다. 예를 들어 표 3에 제시된 각막 종창(부종) 점수는 Haag-Streit BP900 모델(또는 HAAG-Streit BQ900 모델)의 세극등현미경을 사용해 깊이측정기 No. 1의 세극광의 폭을 9½(0.095 mm와 동일함)로 조정 한 후, 각막의 두께를 기록하였을 때만 적용될 수 있다.

표 3. 각막 종창(부종)에 대한 ICE 분류 기준

평균 각막 종창(부종)(%)*	ICE 분류
0 ~ 5	I
> 5 ~ 12	II
> 12 ~ 18(노출 후 > 75 분)	II
> 12 ~ 18(노출 후 = 75 분)	III
> 18 ~ 26	III
> 26 ~ 32(노출 후 > 75 분)	III
> 26 ~ 32(노출 후 = 75 분)	IV
> 32	IV

*모든 시점에서 관찰된 최고 평균 점수

표 4. 각막 혼탁도에 대한 ICE 분류 기준

최고 평균 혼탁도 점수*	ICE 분류
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	III
2.6 ~ 4.0	IV

*모든 시점에서 관찰된 최대 평균 점수 (표 1의 혼탁도 점수에 근거)

표 5. 평균 플루오레세인 잔류도에 대한 ICE 분류 기준

노출 후 30 분 시점의 평균 플루오레세인 잔류 점수*	ICE 분류
0.0 ~ 0.5	I
0.6 ~ 1.5	II
1.6 ~ 2.5	III
2.6 ~ 3.0	IV

*표 2의 점수를 바탕으로 산출

2.2. 시험물질에 대한 생체의 분류는 각막 종창(부종), 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도의 각 범주를 종합하여 표 6에 제공된 방식에 의하여 GHS 분류 체계에 따라 평가한다.

표 6. 전체 생체의 분류

UN GHS 분류	평가 항목 3개의 조합
No Category (비자극)	3 X I 2 X I, 1 X II 2 X II, 1 X I
예측불가	기타 조합
카테고리 1	3 X IV 2 X IV, 1 X III 2 X IV, 1 X II* 2 X IV, 1 X I* 30 분 시점의 각막 혼탁도 = 3(최소 2 개 이상의 안구에서) 관찰 시점 중 어느 하나에서 각막 혼탁도 = 4(최소 2 개 이상의 안구에서) 상피의 심한 혈거워짐 (최소 1 개 이상의 안구)

*발생 가능성 낮음

3. 시험의 성립조건

3.1. 음성 또는 용매대조군 및 양성대조군이 각각 GHS NC 및 카테고리 1로 확인되면 시험이 성립한다고 간주된다.

4. 시험결과의 보고

시험의 보고는 다음 정보를 포함한다.

4.1. 시험물질과 대조물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 입수 가능한 물질정보
- (2) 시험물질, 대조물질 또는 혼합물질의 순도와 조성(중량 %) (가능한 범위내에서)
- (3) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질: 성분의 화학적 동일성, 순도, 함량 및 관련있는 물리·화학적 성질
- (4) 물리화학적 성질(물성, 휘발성, pH, 안정성, 화학적 분류, 용해도 등)
- (5) 시험 전 시험/대조 물질 처리방법(예: 가온, 분쇄)
- (6) 알려져 있는 범위의 보관 조건 및 안정성 정보

4.2. 시험의뢰자와 시험 기관 정보

- (1) 시험 의뢰자, 시험 장소 및 시험 책임자의 이름과 주소
- (2) 안구의 공급처 관련 정보(예: 안구를 수집한 장소)

4.3. 시험조건

- (1) 사용한 시험 시스템에 대한 기술
- (2) 사용한 세극등현미경에 관한 정보(예: 모델명) 및 기기 설정 사항
- (3) 음성 및 양성대조군의 축적된 결과에 대한 참고문헌, 타당한 기준 대조군 범위를 입증하는 축적된 자료
- (4) 시간 경과에 따른 시험법의 완전성(예: 정확도 및 신뢰도)을 확보하기 위한 절차(예: 숙련도 물질을 이용한 주기적 시험)
- (5) 조직병리가 수행되는 경우 조직 고정에 사용되는 절차

4.4. 안구의 수집 및 준비

- (1) 닭의 주령과 체중 및 기타 특징(예: 성별, 계통)
- (2) 안구의 보관과 운반 조건(예: 안구를 수집한 날짜와 시간, 닭의 머리를 수집한 후 적출된 안구를 관류장치 챔버에 넣는 데까지 소요된 시간)
- (3) 안구 준비와 장착, 안구의 품질, 챔버의 온도, 시험에 사용되는 안구 선택 기준

4.5. 시험절차

- (1) 시험을 반복한 횟수
- (2) 사용된 음성 및 양성대조군의 정보(가능하다면 용매와 기준물질도 포함)
- (3) 시험물질의 농도, 적용, 노출시간
- (4) 관찰 시점(처리 전과 후)
- (5) 조직병리를 포함하여 결과의 평가와 결정 기준에 대한 설명 (해당되는 경우)
- (6) 조직병리 관찰에 사용되는 검토 시스템 (해당되는 경우)
- (7) 시험의 허용 기준에 대한 설명
- (8) 시험 절차 수정 시 이에 대한 기록 및 설명

(9) 표준운영절차(SOP)에 포함되어 있지 않은 경우에는 다음의 정보를 포함

- 시험자의 교육, 시험내용의 시험실간 이전
- 고정액, 탈수 및 청정제, 사용한 프로토콜
- 포매 재료, 침투 용매 및 사용한 농도
- 조직 단면의 두께
- 염색 및 사용한 프로토콜

(10) 사용된 기기에 대한 정보

4.6. 결과

- (1) 모든 관찰 시점에서 각각의 안구로부터 얻은 각막 종창(부종), 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수와 모든 안구의 평균 점수를 도표화
- (2) 형태학적 효과에 대한 설명
- (3) 각막 종창(부종), 각막 혼탁도, 플루오레세인 잔류도 점수의 최고 평균값과 여기서 도출한 ICE 분류
- (3) 조직병리학적 반 정량기록 관찰 결과 및 도출된 결론(해당되는 경우)
- (4) 조직병리학적 기록을 위한 국소 효과 사용표시(해당되는 경우)
- (5) 관찰된 다른 결과에 대한 설명
- (6) 도출한 생체 외 GHS 분류
- (7) 처리군 및 대조군 안구의 사진(필요할 경우)
- (8) 조직병리학 표본의 이미지 또는 슬라이드 스캔(해당되는 경우)

4.7. 결과의 토의

4.8. 결론

부록 1

숙련도 확인 시험물질

이 시험방법을 일상적으로 사용하기 전에 먼저 해당 실험실은 표 7에서 추천하는 13 종의 숙련도 확인 시험물질을 사용하여 안구위험등급을 정확하게 식별하여 해당 실험실의 기술적 능력을 입증해야 한다. 아래 제공된 ICE 결과는 시험기간동안 관찰되었거나 예측할 수 있는 반응범위의 예를 나타내고 있다. 목록에 등재된 화학물질을 구할 수 없거나 다른 이유로 사용할 수 없는 경우, ICE 시험방법의 평가 및 검증에 사용된 다른 화학물질을 사용할 수 있다. 다만, 이때는 그 타당한 논리적 근거를 제시하여야 한다.

표 7. ICE 기술 능력을 입증하기 위한 권장 화학 물질

숙련도물질	CAS번호	화학 등급	물리적 상태	생체 내 UN GHS 분류	ICE UN GHS 분류
Benzalkonium chloride(10%)	8001-54-5	Onium compound	액체	Category 1	Category 1
Chlorhexidine	55-56-1	Amine, amidine	고체	Category 1	Category 1
Sodium hydroxide(10%)	1310-73-2	Alkali	액체	Category 1	Category 1
Imidazole	288-32-4	Heterocyclic	고체	Category 1	Category 1
Trichloroacetic acid(30%)	76-03-9	Carboxylic acid	액체	Category 1	Category 1
2,6-Dichlorobenzoyl chloride	4659-45-4	Acyl halide	액체	Category 2A	No predictions can be made
Ammonium nitrate	6484-52-2	Inorganic salt	고체	Category 2A	No predictions can be made
Sodium hydroxide (1%)	1310-73-2	Alkali	액체	Category 2B	No predictions can be made
Dimethy sulfoxide	67-68-5	Organic sulphur compound	액체	No Category	No Category
Ethyl trimethyl acetate	3938-95-2	Ester	액체	No Category	No Category
Methylcyclopentane	96-37-7	Hydrocarbon (cyclic)	액체	No Category	No Category
n-Hexane	110-54-3	Hydrocarbon (acyclic)	액체	No Category	No Category
Triacetin	102-76-1	Lipid	액체	No Category	No Category

제49항 설치류 자궁비대 반응시험

I. 개요

1. 목적

이 시험법은 자궁 무게 증가나 자궁비대 반응을 측정하여 천연 에스트로겐(17β -에스트라디올)에 작용하거나 길항하는 화학물질을 동정하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 에스트로겐 작용

포유류 기관에서 17β -에스트라디올처럼 작용하는 화학물질의 능력

2.2. 항에스트로겐 작용

포유류 기관에서 17β -에스트라디올의 활성을 억제하는 화학물질의 능력

2.3. 최대 내성 용량 (MTD)

실험동물을 치사시키지 않는 최대 용량

2.4. 자궁비대

자궁 조직 성장에 대한 양성 영향을 묘사하는 단어

II. 시험

1. 원리

이유 후 사춘기 이전의 미성숙 암컷 설치류에 시험물질을 3 일간 연속 투여하거나 또는 적절한 시기에 난소를 절제하여 자궁 조직이 퇴행된 약령성숙 암컷 설치류에 적어도 3 일간 연속 투여한 후 24 시간 이내에 부검하여 자궁의 평균 무게를 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

(1) 일반적으로 랫드를 권장한다. 자궁의 반응이 낮은 것으로 알려져 있는 종은 사용하지 않는다.

- (2) 실험동물은 무작위로 선별한 후 개체마다 표시를 한다. 가급적 미성숙 동물은 이유기까지 어미 또는 양육모와 함께 사육하는 것이 좋다. 약령성숙 동물과 미성숙 동물들은 시험 시작하기 전 5 일간 순화시킨다. 만약 미성숙 동물을 어미 없이 이유한 상태로 입수하였다면 순화기간을 더 짧게 할 수도 있다.

2.2. 사육조건

- (1) 실험동물의 사육실 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 이며, 습도는 30 % ~ 70 %이나, 가능한 50 % ~ 60 %가 되도록 조절한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기는 12 시간 간격으로 설정한다.
- (2) 사료와 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 어린 성숙 동물은 개별 사육 또는 3 마리까지 집단 사육할 수 있으며, 미성숙 동물은 집단 사육을 권장한다.
- (3) 실험동물용 사료는 식물성에스트로겐 또는 높은 대사 에너지를 포함하지 않는 사료를 선택한다. Sprague-Dawley계와 Wistar계 미성숙 랫드의 경우, 사료 1 g 당 350 μg 제니스테인을 초과하지 않아야 한다.
- (4) 깔짚은 식물성에스트로겐 함량이 최소로 함유된 것을 사용한다.

3. 시험방법

3.1. 동물 준비

3.1.1. 동물 수

- (1) 투여군과 대조군은 각각 적어도 6 마리의 실험동물을 포함한다.

3.1.2 미성숙 동물

- (1) 미성숙 동물을 사용하는 경우에는 출생일을 확인하고 생후 18 일에 이른 이유 후에 바로 시험을 시작한다. 투여는 생후 21 일에서 적어도 생후 25 일 이전에 완료해야 한다.

3.1.3. 난소적출 동물

- (1) 난소 적출은 생후 6 주 ~ 8 주에 하고, 자궁이 최소한의 안정한 기저수준으로 돌아가도록 적어도 14 일이 지난 후에 첫 투약을 시작한다. 실험동물을 사용하기 이전에 최소한 연속하여 5 일간 질의 표피 세포를 관찰하고 발정기에 들어

간 실험동물은 사용하지 않는다. 부검 시에 난소적출 부위에 난소 조직이 남아 있다면 그 동물은 분석에서 제외한다.

- (2) 난소 적출은 실험동물을 마취한 후 외측면 복막을 절개하여 무균 장소에서 난소를 꺼내어 난관과 자궁의 접합부에서 절단한다. 과다 출현이 없음을 확인한 후, 봉합하고 수술 후 진통제를 투여한다.

3.1.4. 체중

- (1) 난소적출 동물은 체중과 자궁 무게가 비례하지 않지만, 미성숙 모델은 체중과 자궁 무게가 연관이 있으므로 시험이 시작될 때 실험동물의 체중 편차는 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.
- (2) 실험동물을 무작위로 배분하였을 때 각 그룹의 평균 체중은 통계적으로 유의한 차이가 없어야 한다.

3.2. 시험물질의 투여

- (1) 대조군과 최소 두 단계 용량의 투여군이 필요하며 대조군은 시험물질의 투여 이외에는 동일한 방법으로 다루어야 한다.
- (2) 최대용량은 MTD (최대 내성용량)로 하고, 최대 1,000 mg/kg/day까지 연속 3일간 투여한다.
- (3) 경구 또는 피하주사로 투여한다. 1일 1회 투여하며 투여용량은 5 mL/kg을 초과하지 않도록 하며, 수용액일 경우 10 mL/kg까지 사용할 수 있다.
- (4) 가능하면 수용액/현탁액을 고려하지만, 비친수성인 경우 가장 보편적인 기름 용액/현탁액을 사용한다. 용매대조군과 용매를 포함하지 않은 대조군을 비교한다. 시험 물질은 적어도 95 % 에탄올이나 다른 적절한 용매에 용해하고 시험 용매로 희석되어야 한다.
- (5) 미성숙 암컷 랫드는 연속 3일 동안 투여하고, 난소 적출 암컷 랫드는 연속 3일 동안의 투여가 권고되나 3일 이상의 장기간 투여도 가능하다.
- (6) 실험동물의 체중을 매일 측정하여 체중에 따른 투여량을 보정한다.

3.3. 관찰사항

3.3.1. 임상관찰

- (1) 최소한 1일 1회 관찰하며 매일 같은 시간에 관찰하도록 한다.

(2) 사망률, 이환율, 일반 임상 증상을 관찰한다.

3.3.2. 체중과 섭취량

- (1) 투여 개시 직전부터 매일 0.1 g 단위까지 체중을 측정한다.
- (2) 선택 측정으로 사료 소비량을 케이지 단위로 측정할 수 있다.

3.4. 자궁 적출과 무게 측정

- (1) 마지막 투여 후 24 시간에 안락사 시키고 젖은 자궁 무게와 물기를 제거한 자궁 무게를 모두 측정한다. 젖은 자궁 무게는 자궁과 내강액 모두를 포함하며, 물기를 제거한 자궁 무게는 내강액을 제거한 후 측정한다.
- (2) 미성숙 동물은 절개 전 질개구의 상태를 조사한다.
- (3) 적출한 자궁은 조직이 건조하지 않도록 빠르게 측정한다. 젖은 자궁 무게는 내강액이 있는 자궁을 0.1 mg 단위까지 측정하고, 물기를 제거한 자궁 무게는 자궁을 약간 젖은 거름지에 올려놓고, 내강액을 완전히 제거한 후 0.1 mg 단위까지 측정한다.

3.5. 조직 검사

필요시 자궁에 대한 조직병리학적 검사를 실시할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 평가

- (1) 용매대조군과 비교하여 투여군의 자궁 무게가 통계적으로 유의하게 증가 ($P \leq 0.05$)하면 양성이다.
- (2) 최대 내성 용량을 초과하지 않는 범위 내에서 시험자료를 해석한다.
- (3) 용매대조군의 경우 물기를 제거한 자궁 무게가 미성숙 암컷 랫드의 0.09 % 미만이고, 난소 적출 성체 암컷의 0.04 % 미만일 경우 그 시험은 적절한 것으로 본다.

2. 시험결과의 보고

2.1. 시험 기관

- (1) 시험 기관의 책임자
- (2) 기준 양성대조군 시험의 자료와 주기적인 양성대조군 자료

2.2. 시험물질의 정보

- (1) 시험물질의 특징
- (2) 물리적 특성과 관련된 물리화학적 특성
- (3) 희석액을 준비하는 방법과 빈도
- (4) 안정성에 대한 모든 자료
- (5) 투여 용매에 대한 분석

2.3. 용매 정보

- (1) 시험 용매에 대한 특성
- (2) 용매 선택 이유

2.4. 시험동물에 관한 정보

- (1) 종과 계통, 선택 이유
- (2) 공급처와 특정 공급 시설
- (3) 공급 시 주령과 출생일
- (4) 미성숙 동물이라면, 어미나 양육모와 함께 공급되었는지 여부, 이유한 날짜
- (5) 새 환경 순응 과정에 대한 세부사항
- (6) 케이지 당 동물 수
- (7) 개별 동물과 그룹 식별 방법과 세부사항

2.5. 시험조건

- (1) 무작위 배정과정의 세부사항(즉, 사용된 방법)
- (2) 용량설정의 근거
- (3) 시험 물질 용액의 세부사항, 농도 분석값, 안정성과 균질성
- (4) 시험 물질 투여경로의 세부사항과 노출 경로 선택의 이유
- (5) 사료(명칭, 종류, 공급처, 함유성분, 알려진 경우의 식물성에스트로겐 양)
- (6) 음용수 공급과 공급법
- (7) 깔짚(명칭, 종류, 공급처, 함유성분)
- (8) 케이지 환경 기록, 조명 간격, 방의 온도와 습도, 청소
- (9) 부검의 세부적 서술과 자궁 무게 측정 방법
- (10) 통계 과정의 서술

2.6. 시험결과

2.6.1. 개별 실험동물 결과

- (1) 매일 개별 동물의 무게 측정(군 배정부터 부검까지)(0.1 g자리까지)
- (2) 시험물질을 투여하기 시작하였을 때 각 동물의 주령(출생일이 day 0)
- (3) 각 투여한 날짜와 시간
- (4) 투여액량의 계산치, 투여량과 투여 도중 또는 투여 후 투여액의 손실
- (5) 동물 상태에 관한 증상 및 관찰결과를 포함한 매일의 기록
- (6) 의심되는 사망의 원인(시험 중 빈사 상태나 사망이 발견되었다면)
- (7) 인도적으로 치사시킨 날짜 및 시간으로부터 마지막 투약 시점의 간격
- (8) 젖은 자궁 무게(0.1 mg 자리까지), 해부 또는 무게 측정 중의 내강액 손실의 유무
- (9) 물기를 제거한 자궁 무게(0.1 mg 자리까지)

2.6.2. 실험동물의 각 군 결과

- (1) 매일의 평균 체중(0.1 g자리까지)과 표준 편차(군 배정부터 부검까지)
- (2) 젖은 자궁 평균 무게와 물기를 제거한 자궁 평균 무게(0.1 mg 자리까지)와 표준 편차
- (3) 일일 사료 소비량(동물 당 사료 소비량을 g으로 계산한 것, 측정된 경우)
- (4) 통계적 분석 결과

2.7. 시험결과에 대한 고찰 및 결론

제50항 랫드 수컷 성선비대 반응시험

I. 개요

1. 목적

이 시험법은 거세한 수컷 랫드에서 안드로겐 의존성 조직의 중량 변화에 근거하여 안드로겐 작용물질, 길항물질 또는 5α -환원효소 억제제를 동정하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 안드로겐성 작용

안드로겐 의존성 조직의 성장에 양성 영향

2.2. 항안드로겐 작용

포유류에서 테스토스테론 프로피오네이트(TP)의 작용을 억제하는 능력

II. 시험

1. 원리

- (1) 수컷을 거세하고, 거세 후 표적 조직을 퇴축시켜 안드로겐 생산을 최소한으로 하여 반응성을 평가한다.
- (2) 안드로겐 활성화는 시험물질을 10 일간 연속 투여하고 24 시간 후 부검하여 표적 기관의 중량이 통계적으로 유의하게 증가하였는지 평가한다.
- (3) 항안드로겐 활성화는 매일 테스토스테론 프로피오네이트(TP)와 함께 시험물질을 10 일간 연속 투여하고 24 시간 후 부검하여 표적 기관의 중량이 통계적으로 유의하게 감소하였는지 평가한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

수컷 성선비대 반응 시험은 랫드를 사용한다. Fisher 344 랫드 유래 계통은 특수한 경우를 제외하고는 사용하지 않는다. 군 당 최소 6 마리를 사용한다.

2.2. 사육조건

실험동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지하며, 습도는 30 % ~ 70 %로 유지하도록 하되, 가능하면 50 % ~ 60 %가 되도록 조절한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다. 사료와 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 실험동물은 집단사육하며, 개체식별을 한다.

3. 시험방법

3.1. 거세와 거세 후 순화

- (1) 동물을 입수한 후 순화시킨 후 생후 42 일 이후에 거세한다.
- (2) 실험동물을 마취하고 음낭을 절개하여 고환과 부고환을 적출하고 지혈 후 음낭을 봉합한다. 수술 후에는 진통제를 투여하여 고통을 완화시킨다. 만일 거세된 동물을 구입한 경우 공급원으로부터 동물의 일령과 성적 성숙 단계의 보증이 필요하다.
- (3) 사육실 환경에 순화시키면서 표적 조직의 중량이 감소할 때까지 거세 후 최소 7 일간 사육한다. 매일 관찰하면서 질병의 징후나 신체적 이상을 보이는 동물은 제외시킨다.
- (4) 시험물질의 투여 개시는 빨라야 생후 49 일이나 늦어도 생후 60 일을 지나서는 안 되며, 부검은 생후 70 일을 지나서는 안 된다.

3.2. 실험동물의 체중

- (1) 시험개시 때 사용동물의 체중 편차가 평균 체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않도록 한다.
- (2) 실험동물 체중분포를 기준으로 무작위 배정하고 각 군 간의 평균 체중은 통계적으로 유의한 차이가 없도록 한다.
- (3) 투여군의 체중은 대조군 대비 감소할 가능성이 있으므로 통계 공변량으로 시험물질 투여 첫날의 체중을 사용한다.

3.3. 투여용법

- (1) 안드로겐 활성을 확인하기 위해서는 두 용량군의 시험물질, 양성대조군, 용매(음성) 대조군을 두고, 항안드로겐 활성을 확인하기 위해서는 최소 3 개의 시험물질 투여군, 양성대조군, 음성대조군을 둔다.

- (2) 최고용량은 동물의 최종 체중 감소가 대조군 대비 10 %를 넘지 않도록 한다. 10 일간 연속투여해도 현저한 독성과 고통을 수반하지 않는 최대 용량(다만, 최대 1,000 mg/kg/day) 또는 (항)안드로겐 효과를 나타내는 용량 중 낮은 용량으로 한다.
- (3) 10 일간 투여하고, 최종 투여 약 24 시간 후에 표적 조직을 적출하여 중량을 측정한다.

3.4. 기준물질과 용매

- (1) 표준 안드로겐 작용물질은 테스토스테론 프로피오네이트(TP, CAS 번호 57-82-5)이며, 0.2 mg/kg/day 혹은 0.4 mg/kg/day로 한다.
- (2) 표준 안드로겐 길항물질은 플루타마이드(FT, CAS 번호 1311-84-7)이며, 3 mg/kg/day로 TP와 동시에 투여한다.
- (3) 가능한 수용액/현탁액을 우선적으로 고려할 것을 권고하지만, 일반적으로 기름 용액/현탁액을 사용한다. 시험물질은 극소량의 95 % 에탄올이나 다른 적절한 용매에 용해되어야 하고 최종적으로 시험 용매에 희석하여 사용한다. 필요한 투여량의 희석액은 매일 조제한다.

3.5. 투여 방법 및 투여량

- (1) TP는 피하 주사하며, FT는 경구 투여한다.
- (2) 시험물질은 경구투여 혹은 피하주사한다.
- (3) 10 일간 연속해서 대략 24 시간의 간격으로 투여하며 매일 측정된 체중값을 근거로 투여량을 조정한다.
- (4) 경구투여의 경우, 1 회 투여 가능한 최대 액량은 5 mL/kg을 초과해서는 안 되며, 수용액은 10 mL/kg까지 투여할 수 있다.
- (5) 피하주사의 경우, 등 쪽 어깨뼈 부위 및/또는 요추 부위에 투여하며 1 일 총 투여용량은 0.5 mL/kg을 초과해서는 안 된다.

3.6. 관찰 및 측정

- (1) 적어도 1 일 1 회 관찰하며 예상되는 영향이 최대가 되는 기간을 고려하며 매일 같은 시간에 수행하는 것이 바람직하다.
- (2) 사망률, 이환율, 그리고 일반적 임상 증상을 관찰하며 중간 사망한 동물은 분석에서 제외하며, 빈사 상태의 동물은 안락사 시킨다.

- (3) 체중은 매일 0.1 g 단위로 측정한다.
- (4) 시험물질 최종 투여 한 뒤 약 24 시간 후, 안락사 및 채혈 후 부검한다. 5 종류의 안드로겐 의존성 조직(전립샘, 정낭, 항문올림근과 음경해면체 근육, 양측 쿠퍼샘, 음경귀두)을 씻은 채로 0.1 mg 단위까지 칭량하여 기록한다.
- (5) 필요한 경우, 간, 양측 신장, 양측 부신을 측정한다.
- (6) 필요한 경우, 혈청 황체형성호르몬(LH), 여포자극호르몬(FSH)과 테스토스테론(T)을 측정한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과 분석

- (1) 부검 시의 체중과 기관 중량은 통계처리 한다.
- (2) 안드로겐 활성작용: 시험물질 투여군에서 안드로겐 의존성 표적 조직 중량 중 2 종류 이상의 조직에서 용매대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가 ($P \leq 0.05$)가 있는 경우 양성으로 판정한다.
- (3) 안드로겐 길항작용: 대조군은 표준 안드로겐(TP) 단독투여군으로 하여 시험물질 투여군에서 안드로겐 의존성 표적 조직 중량 중 2 종류 이상의 조직에서 대조군(TP 단독투여군)에 비해 통계적으로 유의한 감소 ($P \leq 0.05$)가 있는 경우 양성으로 판정한다.
- (4) 각 시험자료는 평균, 평균의 표준 오차, 시료 수를 포함하여 표의 형태로 요약하며, 개별적 시험자료도 표로 요약한다. 대조군의 시험자료는 변이계수(CV) 값을 비교하여 시험값으로서 적절한지 확인한다. (부록 1)

2. 시험결과의 보고

2.1. 시험 기관

- (1) 시험 기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명
- (3) 시험 개시일과 종료일

2.2. 시험물질의 정보

- (1) 공급처, 로트/배치 번호, 식별자료, 순도, 공급자의 전체 주소와 시험물질들의 특성

- (2) 물리적 성질과 필요에 따라서는 물리화학적 특성
- (3) 저장 조건과 희석액 조제 방법 및 빈도
- (4) 안정성에 관해 얻은 모든 시험자료
- (5) 투여용액/현탁액에 관한 모든 분석 자료

2.3. 용매 정보

- (1) 용매의 특성
- (2) 용매 선택의 당위성

2.4. 시험동물에 관한 정보

- (1) 사용된 종/계통 및 선택 이유
- (2) 동물의 공급원 또는 공급처(주소 포함)
- (3) 공급된 동물 수와 일령
- (4) 사육 환경(온도, 빛 등)
- (5) 사료(명칭, 종류, 공급처, 로트 번호, 성분, 알려진 경우 식물성에스트로겐의 농도)
- (6) 깔짚(명칭, 종류, 공급처, 성분)
- (7) 케이지 환경 및 케이지 당 동물 수

2.5. 시험조건

- (1) 거세 시의 일령과 거세 후 순화 기간
- (2) 시험 개시 때의 개체 당 체중(0.1 g 단위까지)
- (3) 무작위 추출 방법과 용매, 표준물질, 시험물질 투여군의 분할 기록, 케이지 할당 기록
- (4) 시험기간 중 체중측정일의 각 군의 평균 체중과 표준편차
- (5) 투여량 설정 근거
- (6) 시험물질의 투여 경로와 노출 경로의 선택 근거
- (7) 항안드로겐의 분석법이라면 TP 투여(용량과 투여용액량)
- (8) 시험물질 투여(용량과 투여용액량)
- (9) 투여 시간
- (10) 부검 절차(채혈과 마취방법을 포함)
- (11) 혈청 분석 수행 시, 수행 방법

2.6. 시험결과

- (1) 투여 기간 중의 체중(0.1 g 단위), 임상증상, 사료 섭취량(측정한 경우)
- (2) 각 동물의 부검자료
 - 부검일시, 해부자
 - 투여군, 개체식별번호, 동물의 주(일)령
 - 부검시 최종 체중
 - 부검시 해부 순서
 - 5 종의 안드로젠 의존성 조직의 중량(0.1 mg 단위)
- (3) 간, 양측 신장, 양측 부신의 중량, 혈청호르몬의 분석자료(측정한 경우)

2.7. 시험결과에 대한 고찰 및 결론

부록 1. 거세 모델의 표적 부속 생식조직의 최대 허용 CV 값

조직	항안드로젠 효과	안드로젠 효과
정낭	40 %	40 %
배측 전립샘	40 %	45 %
항문올림근과 음경해면체 근육	20 %	30 %
양측 쿠퍼샘	35 %	55 %
음경 귀두	17 %	22 %

제51항 확장 1 세대 생식 독성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 3 가지 F1 코호트를 이용하여 시험물질에 의한 특정 생애 단계의 영향을 평가하고, 출생 전과 후의 시험물질 노출 결과로 발생할 수 있는 건강 영향을 평가하는 것을 목적으로 한다. 확장 1 세대 생식 독성 시험은 성적 성숙 후에 수컷과 암컷, 암컷과 태자, 암컷과 차산자(Offspring) 그리고 F1 세대의 상호 작용에 요구되는 생식 종말점에 대한 평가를 포함하여 발달에 대한 시험물질의 산후, 산전 영향뿐만 아니라 수태, 수유중인 암컷에서와 미성숙, 성숙한 차세대 동물에서의 전신독성 평가를 수행하기 위한 것이다.

2. 정의

2.1. 용량(Dose)

투여된 시험물질의 양. 시험물질의 질량(g, mg), 실험동물의 단위 체중 당 시험물질의 질량(예: mg/kg), 또는 사료 중의 일정 농도(ppm)로 표시

2.2. 투여용법(Dosage)

용량, 투여빈도 및 투여기간을 포함하는 일반적인 용어

2.3. 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level)

시험물질 노출과 관련된 유해조건이 관찰되지 않는 용량 중 최대용량

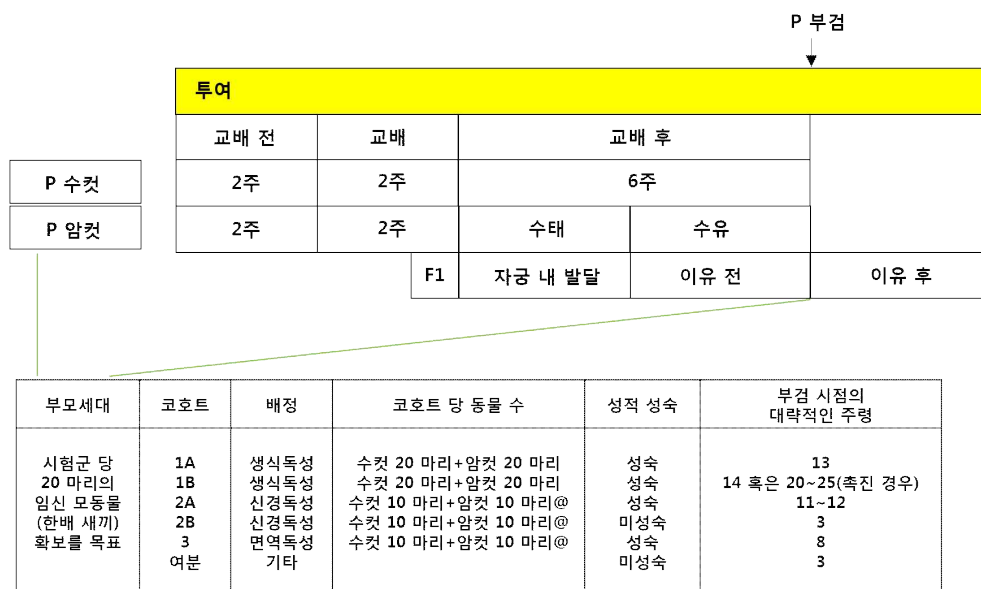
2.4. 발달 독성(Developmental toxicity)

차산자의 생후, 산후, 구조 또는 기능 장애를 나타내는 생식 독성의 발현

II. 시험

1. 원리

(1) 발달 과정에 대한 산전, 산후의 시험물질 영향 뿐 아니라, 수태, 수유기의 암컷, 차세대의 유아기 및 성체에서의 전신 독성을 평가하기 위하여 본 시험에서 시험물질은 성적으로 성숙한 부모세대(P)의 수컷과 암컷 투여군에 점진적인 용량으로 투여한다. P 세대는 교배 전 기간으로 최소 2 주 동안 및 교배 기간 2 주간 투여된다. P 세대 수컷들에게는 적어도 F1이 젖을 땔 때까지, 최소 10 주 동안 투여한다. P 세대 암컷에게는 한배새끼들이 이유할 때까지 수태 기간 및 수유 기간 동안 총 8 주 ~ 10 주간 투여한다. F1 차세대에게는 이유기에서 성체 시기까지 시험물질을 추가로 투여한다. 이유기 때, 선택된 차세대들은 성적 성숙도, 생식기관 보존과 기능, 신경학적, 행동학적 종말점과 면역기능 추가분석을 위해 하위그룹(코호트 1 ~ 3)에 할당되어 평가된다. 전체적인 시험 도식은 그림 1에 표현되어 있다.



@ 가능하면 20 마리 모동물 한배 새끼 중 각 한 마리를 선정함으로써 대표성을 나타내도록 함

그림 1. 확장 1 세대 생식 독성 시험 도식도

- (2) 3 가지 F1 동물의 코호트를 이용하여 시험물질에 의한 다음 영향을 평가한다.
- 코호트 1: 생식/발달 관련 종말점을 평가. F2 세대를 포함하도록 확장 가능함.
 - 코호트 2: 발달중인 신경계에 대한 화학 물질 노출의 잠재적 영향 평가.
 - 코호트 3: 발달중인 면역 체계에 대한 화학 물질 노출의 잠재적 영향 평가.
- (3) 본 시험에서 확보된 자료를 이용하여 무영향관찰용량(NOEL), 최소영향관찰용량(LOEL, Lowest Observed Adverse Effect Level) 및 다양한 종말점에 대한 기준용량(BMD, Bench Mark Dose)을 결정할 수 있어야 하며 이전 시험들에서 발견된 영향을 특성화하는 데 사용하거나 이후 시험을 위해 참고할 수 있어야 한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

- (1) 기존 자료의 범위와 일반 독성 시험과의 비교 가능성 때문에 일반적으로 랫드가 선호되며, 이 시험법에서 제시된 기준과 권고 사항은 랫드를 기준으로 한다. 다른 종을 사용하는 경우, 타당성을 설명하고 시험방법을 적절히 수정할 필요가 있다. 번식능력이 부족하거나 발달 장애의 빈도가 높다고 잘 알려진 계통(Strains)은 사용하지 않아야 한다. 수태한 적이 없거나 수태한 상태가 아닌 건강한 젊은 성체 동물을 사용한다. P 동물들은 성적으로 성숙하고, 투여 개시 시 성별 내에서 비슷한 체중을 보이며, 교배 시 약 90 일령 정도의 비슷한 연령이 되어야 한다.
- (2) 실험동물은 대조군과 투여군에 무작위로 할당되며, 사육 케이지의 배치로 인해 동물에게 미칠 수 있는 영향은 최소화한다. 최소 5 일간 순화기간을 둔다.
- (3) 일반적으로 각 시험군과 대조군에는 충분한 양의 교배 쌍을 두어 시험군 당 수태 암컷을 20 마리 이상 확보할 수 있도록 한다.
- (4) 투여 시작 전에 각 P 동물에게 고유한 식별 번호를 지정한다. 투여 시작 전 암컷의 성 주기 평가가 필요할 수 있다. 생후(PND) 0 또는 1 일 처음 검사받을 때 모든 F1 차세대를 고유하게 식별한다. 한배새끼가 어느 모동물로부터 분만된 동물인지를 나타내는 기록은 모든 F1 동물 및 적용 가능한 경우 F2 동물에 대해 시험 기간 동안 유지되어야 한다.

2.2. 사육조건

- (1) 모든 절차는 해당 실험동물 관리기준을 준수한다. 동물실 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 로 유지하며, 상대 습도는 30 % 이상, 70 % 이하로 유지한다. 조명은 인공조명으로 12 시간 간격으로 명암을 조절한다. 사료는 일반적으로 넠리 쓰는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취 가능하도록 한다. 식물성 에스트로겐 함량을 높이는 것이 일부 생식 종말점에 영향을 줄 수 있으므로 식물성 에스트로겐 함량을 주의하여 조절한다. 에스트로겐 물질함량이 적으며, 조성이 알려진 표준화된 사료를 사용한다.
- (2) 동물들은 개체별로 사용하여야 한다는 과학적 근거가 있지 않은 한, 같은 성별의 소규모 집단으로 사육한다. 교배 절차는 적절한 케이지에서 수행한다. 교배기간 후 수컷의 경우에는 개별적으로 수용할 수 있다. 교배가 확인된 후, 수태중으로 추정되는 암컷은 수태와 분만을 위한 환경이 제공되는 분만 또는 모체 케이지에 각각 사육한다. 한배새끼들은 이유할 때까지 어미와 함께 사육한다. F1 동물은 이유에서 종결까지 같은 성 및 투여군 별 소그룹으로 사육한다. 과학적으로 타당하다면, 동물을 개별적으로 수용할 수 있다. 선택된 깔짚 재료에 함유된 식물성 에스트로겐의 양은 최소가 되도록 한다.

2.3. 시험물질

- (1) 시험물질의 기존 정보를 검토하는 것은 투여 경로, 용매 선택, 동물종 선택, 투여용법 선택 및 투여 일정의 잠재적 변경에 대해 결정하는데 중요하다. 물리·화학적, 종 특이적 대사를 포함한 독성동태학, 독성동력학 특성, 구조-활성 상관관계, 생체 외 대사 과정, 기존 독성 시험 결과 및 구조 유사체에 대한 관련 정보 등 시험물질에 관한 모든 관련 정보를 고려한다.
- (2) 기존 독성동태학 자료는 시험 설계 계획, 용량 선택 및 결과 해석에 매우 유용하다. 본 시험 종말점의 수집 및 해석을 방해하지 않는다면 보충적인 독성동태학 자료는 본 시험 도중에 수집될 수도 있다. 일반적으로, 다음 독성동태학 자료는 확장 1 세대 생식 독성 시험 계획에 유용할 것이다.
 - 수태 후기(예를 들면, 수태 20 일) - 모체 혈액 및 태자 혈액

- 중기 수유기(생후 10 일) - 모체 혈액, 새끼 혈액 및/또는 모유
 - 이유후 초기(예를 들면, 생후 28 일) - 이유아 혈액 표본
- (3) 시험물질을 적합한 용매에 녹이거나 현탁시킨다. 가능한 한, 수용성의 용액/현탁액이 우선적으로 고려된다. 차선택으로 유성(예: 옥수수 기름) 용액/현탁액이 고려되며, 다음으로 다른 용매 중에서 가능한 용액을 고려한다. 비수성 용매를 이용하는 경우, 해당 용매의 독성 정보가 필요하다. 용매 내 시험물질의 안정성과 균일성은 확립되어야 한다.

3. 시험방법

3.1. 시험물질의 투여

3.1.1. 투여경로

- (1) 경로 선택은 인체 노출과 가장 유사한 경로를 고려한다.
- (2) 시험물질을 위관투여법으로 투여하는 경우, 한 번에 투여 할 수 있는 액체의 최대 부피는 일반적으로 100 g 체중 당 1 mL를 초과하지 않도록 하되, 옥수수기름과 같은 유성 액체의 경우 0.4 mL/100 g을 최대로 한다. 매일 비슷한 시간에 투여하며, 각 동물에 대한 용량은 일반적으로 가장 최근의 개별 체중 측정에 근거한다. 성체 수컷과 성체 비 수태 암컷에서 적어도 매주 조정하고, 수태한 암컷과 이유기 전과 이유 2 주 후의 F1 동물들은 2 일 마다 조정하도록 한다. 독성동태학 자료에서 시험물질의 태반 전이가 낮다면, 어미에 과도한 독성 용량을 투여하지 못하도록 수태 마지막 주 동안의 위관투여량을 조정해야 할 수도 있다. 암컷은 출산 당일에 위관투여법이나 다른 경로로의 투여를 받지 않도록 하여, 출생 과정에서 교란이 일어나는 것을 방지한다.
- (3) 시험물질이 사료나 음용수를 통해 투여되는 경우, 시험물질의 양이 정상 영양이나 음용수 균형을 해치지 않는 것이 중요하다. 사료에서 시험물질의 함량, 균질성 및 안정성을 검증해야 한다. 사료와 음용수는 정기적으로 오염되었는지 분석해야 한다.
- (4) 차세대 동물에의 시험물질 투여는 사료를 통한 방법이 선호된다. 위관투여법 시험이 수행되는 경우, 이유 시 직접 투여가 시작될 때까지 새끼들은 대개 모

유를 통해 간접적으로만 시험물질을 섭취하게 된다. 사료나 음용수를 통해 시험물질을 투여하면, 수유기 마지막 주에 새끼가 스스로 먹기 시작하면서 추가적으로 직접 시험물질을 섭취하게 된다. 모유를 통한 시험물질의 이행이 적고 차세대의 지속적인 노출에 대한 증거가 부족한 경우에 시험 계획의 변경을 고려한다.

3.1.2. 투여용량

- (1) 일반적으로 최소 3 개의 시험군과 1 개의 대조군을 둔다. 적절한 용량 수준을 선택할 때, 이전 시험의 투여 정보, 수태 또는 비 수태 동물의 독성동태학 자료, 수유를 통한 전달의 정도 및 인체 노출 예상치를 포함하여 가능한 모든 정보를 고려한다.
- (2) 독성동태학 관련 자료가 없는 경우, 시험물질의 물리적/화학적 특성에 의해 제한되지 않는 한 용량 수준은 독성 발현 여부에 따라 결정된다. 최고 투여량 수준은 독성 영향을 유발할 목적으로 선택하되 사망이나 명백한 고통은 유발하지 않도록 한다.
- (3) 용량을 선정할 때에는 해당 용량에서 얻은 시험 자료가 OECD 국가 간의 규제요건(예, 유해 및 위해성평가, 분류 및 표지, 내분비계 장애평가 등)에 적절한 지를 고려하여야 한다.
- (4) 용량 수준은 내림차순으로 선택한다. 무영향관찰용량과 최소영향관찰용량 사이에 큰 용량 간격을 피하기 위해 2 배 또는 4 배 간격이 가장 적합하다. 4 번째 시험군을 추가할 경우 투여량 사이에 매우 큰 간격(예를 들어, 10 배 이상)을 두도록 한다.
- (5) 시험물질 투여를 제외하고, 대조군의 동물은 시험군과 동일한 방식으로 취급된다. 시험물질 투여 시 용매를 사용하는 경우에는 용매만을 투여하는 대조군으로 하거나, 투여를 받지 않거나, 거짓 투여(Sham-treated)를 하여 대조군을 설정한다. 용매를 사용하는 경우, 대조군에게는 가장 많이 사용된 부피의 용매를 투여한다.

3.1.3. 투여일정

- (1) 교배 전 투여 기간은 P 암컷과 수컷에서 정상 상태 노출 조건을 달성할 만큼 충분히 길어야 한다. 대부분의 경우 암수의 교배 전 2 주간 투여가 적절하다고 판단된다. 기존 자료 등을 근거로 필요한 경우, 교배 전 투여 기간을 변경할 수도 있다.
- (2) 교배 전 투여 기간이 정해지면 부검될 때까지 7 일/주 단위로 시험물질을 지속적으로 투여한다. 모든 동물에게 동일한 방법으로 투여한다. 투여는 2 주 교배 기간 동안 지속하고, P 암컷의 경우, 수태 기간 및 수유 기간 동안에서 이유 후 이유 종료 시까지 투여를 지속한다. 수컷에게는 F1 암컷 동물이 이유를 종료할 때까지 동일한 방식으로 투여한다. 선택된 F1 암컷과 수컷의 직접 투여는 수유기에 이미 시작된 경우가 아니라면 이유기에 시작되어 코호트 배정(Cohort assignment)에 따라 예정된 부검까지 계속한다.

3.2. 한계시험

본 시험방법을 이용하여 1,000 mg/kg과 동등한 용량 수준에서 독성이 관찰되지 않고, 시험물질과 구조적으로 유사한 화합물의 기존 정보를 통해 시험물질의 독성이 예상되지 않으면 3 단계 용량을 사용한 시험을 수행할 필요는 없다. 이 경우, 대조군과 적어도 1,000 mg/kg/day의 단일 용량을 사용하여(한계시험) 확장 1 세대 생식 독성 시험을 할 수 있다. 이 한도에서 생식 독성이나 발달 독성에 대한 증거가 발견되면 무영향관찰용량을 확인하기 위해 더 낮은 용량 수준에서의 추가 시험이 필요할 것이다. 인체 노출이 더 높은 용량 수준에서 일어날 가능성이 없을 때에만 이러한 한계시험이 고려될 수 있다.

3.3. 교배 과정 및 이유 후 시험을 위한 새끼 선택

3.3.1. 교배 과정

교미의 증거가 관찰되거나 2 주가 경과할 때까지 각 P 암컷에게 동일한 용량 집단군에서 무작위로 선별된 무관한 수컷을 1 : 1로 교배한다. 임신 0 일은 질전 혹은 정자 발견 등 교배 증거가 확인된 날로 정의한다. 교배가 관찰된 후 가능한 한

빨리 동물을 분리한다. 2 주 후에 교배가 일어나지 않더라도 분리한다. 교배 쌍은 자료에서 명확하게 식별한다.

3.3.2. 한배새끼 크기(Litter size)

생후 4 일째, 한배새끼 당 5 마리의 수컷과 5 마리의 암컷을 무작위로 선택하고, 그 외의 새끼들은 제외한다. 체중 등에 근거하여 선별적으로 새끼를 제외하는 것은 적합하지 않다. 수컷 또는 암컷 새끼의 수가 각 한배새끼 별로 성별 당 4 마리 ~ 5 마리가 되지 않는 경우에 부분적인 조정이 허용된다.

3.3.3. 이유 후 시험을 위한 새끼 선택(그림 1 참고)

(1) 생후 약 21 일 경 이유기에 대조군과 투여군 용량 당 20 마리까지의 새끼를 선별하여 추가 검사를 위해 성적 성숙까지 유지한다. 21 일 경, 선택된 F1 차 세대들을 다음과 같이 3 개의 코호트 중 하나에 무작위로 할당한다.

- 코호트 1(1A 과 1B) = 생식/발달 독성 시험
- 코호트 2(2A 과 2B) = 발달 신경독성 시험
- 코호트 3 = 발달 면역독성 시험

(2) 각 코호트의 구성은 다음과 같다.

- 코호트 1A: 수컷 1 마리, 암컷 1 마리/한배새끼/투여군(20 마리/성별/투여군): 생식 기관 및 일반적인 독성에 대한 영향의 1 차 평가를 위하여 우선적으로 선택함
- 코호트 1B: 수컷 1 마리, 암컷 1 마리/한배새끼/투여군(20 마리/성별/투여군): F1 동물들의 교배에서 생식 행위의 추후 평가와(GD 117(39) 참고), 생식이나 내분비 독성이 의심되는 경우 또는 코호트 1A의 결과가 모호한 경우 추가 병리학 자료를 얻기 위하여 우선적으로 선택함
- 코호트 2A: 총 20 마리 새끼/투여군(투여군 당 10 수컷과 10 암컷; 한배새끼 당 한 마리의 수컷 혹은 암컷): 성체의 신경병리학적 검사 평가 후에 신경행동학적 검사를 위해 할당함
- 코호트 2B: 총 20 마리 새끼/투여군(투여군 당 10 수컷과 10 암컷; 한배새끼

- 당 한 마리의 수컷 혹은 암컷): 이유기(생후 21 혹은 22 일) 신경병리학적 검사를 위해 할당함. 동물이 부족한 경우 코호트 2A에 우선적으로 동물을 할당함
- 코호트 3: 총 20 마리 새끼/투여군(투여군 당 10 수컷과 10 암컷; 가능하면, 한배새끼 당 한 마리) 생후 56 일 \pm 3 일 경, T세포 의존적 항체 반응 분석 (TDAR, T-cell Dependant Antibody Response assay)에서 양성 대조 동물로 사용하기 위해 대조군으로부터 추가 새끼가 요구될 수 있음
- (3) 모든 코호트에 대해 새끼의 수가 부족하다면 코호트 1을 우선적으로 고려한다. 이는 F2 세대를 생산하기 위해 확장될 수 있기 때문이다. 화학 물질이 신경 독성 물질, 면역 독성 물질 또는 생식 독성 물질인 것으로 의심되는 경우처럼 특정 우려가 있는 경우 추가 새끼를 코호트 중 어디에든 할당할 수 있다. 이 새끼는 다른 시점에서의 검사 또는 보충 종말점 평가를 위해 사용될 수 있다. 코호트에 할당되지 않은 새끼는 임상 생화학 검사 및 부검에 사용된다.

3.3.4. P 동물들의 두 번째 교배

두 번째 교배는 일반적으로 P 동물에게 권장되지 않는다. 그 이유는 중요한 정보인 첫째 한배새끼에 대한 착상 수(그리고 착상 후, 분만기 손실, 최기형성의 가능성에 대한 인자)에 대한 정보를 잃게 되기 때문이다. F1 세대의 교배를 포함하도록 시험을 확장함으로써 노출된 암컷에서의 영향을 확인하거나 평가할 수 있다. 그러나, 모호한 결과를 명확히 하거나 첫 번째 교배에서 관찰된 수태능에 대한 추가 특성 규명을 위하여, P 수컷과 투여 받지 않은 암컷과의 두 번째 교배를 선택적으로 수행하기도 한다.

3.4. 관찰사항

3.4.1. 임상관찰

- (1) P 및 선택된 F1 동물의 경우 일반적 임상관찰을 하루 1 회 수행한다. 위관투여법 투여의 경우 투여 전과 투여 후에 관찰하여, 최고 혈장 농도와 관련된 독성 징후가 있는지 확인한다. 하루 2 회 모든 동물에게 심각한 독성, 빈사 및 사망률을 관찰한다.

- (2) 모든 P 및 이유 후 F1 동물에 대한 보다 자세한 조사는 매주 실시한다. 관찰 결과는 점수화 체계를 이용하여 기록하며, 시험조건 변동이 최소가 되도록 한다. 피부, 털, 눈, 점막 등의 변화, 분비물 및 배설물의 발생과 자율신경 활동(예를 들어, 눈물샘, 눈꺼풀 처짐, 동공 크기, 비정상적인 호흡)등을 주목해 관찰한다. 보행 및 자세의 이상, 보정에 대한 반응, 강직성 혹은 긴장성 움직임, 습관장애(예를 들어, 과도한 그루밍, 반복적인 회전) 등과 이상한 행동(예를 들어, 자해, 뒤로 걷기) 등도 자세히 기록한다.

3.4.2. 체중 및 사료/음용수 섭취

- (1) P 동물은 투여 첫날, 그 후 적어도 주 1 회 체중을 측정한다. P 암컷의 체중은 수유 중인 새끼와 같은 날에 측정한다. 모든 F1 동물들의 개별 체중은 생후 21 일경 이유 때 측정하고, 그 후에는 적어도 주 1 회 측정한다. 사춘기(포피의 분리 또는 질 개구 완료)에 도달한 날에도 체중을 측정하고, 안락사 시에도 체중을 측정한다.
- (2) 시험기간 동안 사료와 음용수(시험물질이 음용수를 통해 섭취되는 경우) 섭취는 적어도 일주일마다 체중 측정과 함께 측정한다. F1 동물들의 각 케이지 사료 섭취는 각 코호트의 선택과 함께 시작하여 주마다 기록한다.

3.4.3. 성 주기

- (1) 일반적으로 질 세포검사(Vaginal cytology)에 의한 성 주기 평가는 투여 기간을 시작으로 하여 교배 확인 또는 2 주 교배 기간이 끝날 때까지 계속된다. 질/자궁 경부 세포를 얻을 때, 점막의 교란을 피하고 가임신의 유도를 막기 위해 주의한다.
- (2) 코호트 1A의 모든 F1 암컷에서 질 도말 검사를 실시하여, 질 개방(Vaginal patency) 후 첫 번째 각질화된 도말이 확인될 때까지 두 결과 사이의 시간간격을 확인한다. 코호트 1A의 모든 F1 암컷에 대한 성 주기는 생후 75 일 정도에서 시작하여 2 주 동안 모니터링 한다. F1 세대의 교배가 필요할 경우, 코호트 1B의 질 세포검사는 교배 시작부터 교배 증거가 확인될 때까지 수행된다.

3.4.4. 교배 및 수태

- (1) 체중, 사료 섭취, 빈사/사망 여부 등의 기본적인 임상 관찰 이외에, 교배 날짜, 수정 날짜 및 분만 날짜를 기록하고 교배 이전 기간(암수 합사일에서 교배 성립일까지) 및 수태 기간(교배 성립일에서 분만까지)을 계산한다. 동지를 트는 행동이나 양육 행동에 대한 모든 이상 징후를 기록한다.
- (2) 분만이 일어난 날은 어미에겐 수유 0 일(LD 0) 이고 차세대에겐 생후 0 일(PND 0)이다. 모든 비교는 수태기간의 차이로 인한 출생 후 발달 자료의 혼란을 제거하기 위해 성교 후 시간에 근거하지만, 분만 시점도 기록할 필요가 있다. 이것은 시험물질이 수태 기간에 영향을 미칠 때 특히 중요하다.

3.4.5. 차세대 동물 평가지표

- (1) 분만 후에 가능한 빨리(생후 0 일 혹은 1 일) 새끼의 수와 성별, 사산, 출생 및 심각한 장애(구개열 등의 외관상 이상, 피하 출혈, 비정상적인 피부색과 감촉, 태줄의 존재, 위 안의 모유 부족, 건조한 분비물의 존재 등)을 확인한다. 체온, 활동 상태 및 동물을 다루는 것에 대한 반응을 포함한 질적 평가를 포함한다. 생후 0 일 또는 그 이후에 죽은 것으로 판명된 새끼들은 가능한 결함 및 사망 원인을 조사한다. 살아있는 새끼는 생후 0 일 또는 1 일에 개별적으로 계수하고 체중을 측정하고 그 이후 적어도 생후 4 일, 7 일, 14 일 및 21 일에 정기적으로 관찰한다. 임상관찰 검사는 새끼의 체중 측정 시 반복하거나 출생 시에 특이한 영향이 관찰된 경우에는 더 자주 수행한다.
- (2) 각 새끼의 항문-성기 간 거리(AGD, Ano-Genital Distance)는 생후 0 일 ~ 4 일 사이의 동일한 시기에 측정하며, 체중도 함께 측정한다. AGD는 체중의 세제곱근 등 새끼의 크기로 표준화한다. 수컷 유두 및 유륜 수는 생후 12 일 또는 13 일에 계수한다.
- (3) 모든 선택된 F1 동물들에게 날마다 귀두-포피 분리(Balano-preputial separation) 혹은 질 개구를 검사한다. 지속적인 질 분비물, 요도 하열 또는 갈라진 성기와 같은 생식기 기관의 이상을 기록한다.

3.4.6. 잠재적 발달 신경독성의 평가(코호트 2A와 2B)

- (1) 코호트 2A 동물에서 청각 반응(Auditory startle), 통합 기능 검사(Functional observational battery), 자발운동량, 신경 병리학 평가를 실시한다. 모든 시험 조건의 변화를 최소화하여, 행동에 영향을 줄 수 있는 변수들을 조절한다. 신경 독성 분석의 결과는 적절한 기준 대조군 문헌과 관련하여 해석한다. 코호트 2B 동물은 생후 21 일 또는 22 일에 신경 병리학적 평가를 위해 사용된다.
- (2) 코호트 2A의 동물에서 생후 24 일(\pm 1 일)에 청각 반응 검사(Auditory startle test)를 실시한다. 각 세션은 50 회의 시험으로 구성된다. 세션 간에 적응하기 위한 시험 환경에서 청각 반응 검사를 수행할 때, 10 회 시험을 단위로 평균 반응 정도가 결정되어야 한다.
- (3) 생후 63 일과 75 일 사이의 적절한 시기에, 코호트 2A 동물은 통합 기능 검사 및 자동화된 자발운동량 검사를 받는다. 통합 기능 검사에는 검사 대상의 외형, 행동 및 기능적 완전성에 대한 기술을 포함한다. 측정지표의 목록은 부록 1에 제시되어 있다. 관측자의 변동성을 최소화하기 위해 표준화된 절차를 사용하여 투여군에 대해 식별정보를 모르는 관찰자가 모든 동물을 조심스럽게 관찰한다. 통합 기능 시험의 각 지표는 명시적으로 정의된 단위와 점수 기준이 사용된다. 자발운동량은 활동의 증가와 감소를 모두 감지할 수 있는 자동화된 활성 기록 장치에 의해 모니터링한다.
- (4) 기존 정보가 다른 기능 시험(예를 들면, 감각, 사회적, 인지)의 필요성을 나타내면, 시험에서 수행된 다른 평가의 완전성을 손상시키지 않고 통합되어야 한다.

3.4.7. 잠재적 발달 면역독성의 평가(코호트 3)

생후 56 일(\pm 3 일)에 코호트 3 동물들은 양 적혈구(SRBC, Sheep Red Blood Cells) 또는 키홀림펫헤모시아닌(KLH, Keyhole Limpet Hemocyanin) 같은 T-세포 의존 항원 1 차 IgM 항체 반응 시험에 적용된다. 반응에 대한 평가는 반응의 최고점에서 비장의 특이적 플라크 형성 세포(PFC, Plaque-Forming Cells) 계수, 혹은

효소면역분석법(ELISA)을 이용한 SRBC- 혹은 혈청에서의 KLH-특정 IgM 항체의 역가를 결정하여 평가할 수 있다. 반응은 일반적으로 정맥 주사 접종 후 4 일 후 (PFC 반응) 또는 5 일 후(ELISA)에 최고치를 나타낸다. 시험물질에 대한 노출은 ELISA를 위한 혈청 혹은 PFC 반응을 위한 비장을 수집하기 전날까지 계속해야 한다.

3.4.8. 잠재적 생식독성의 대한 추후 평가(코호트 1B)

코호트 1B 동물은 생후 90 일 이상에서 투여를 계속할 수 있으며, 필요할 경우 F2 세대를 얻기 위해 사육할 수 있다. 같은 용량 투여군의 수컷과 암컷은 생후 90 일에서 시작하여 생후 120 일이 넘지 않도록 2 주간 같이 사육되어야 한다. 남매끼리의 교배는 피한다. 절차는 P 동물에서의 절차와 유사해야 한다. 이유 혹은 그 이상까지 관찰하는 것보다 생후 4 일에 시험을 종료하는 것으로 충분하다.

3.5. 검사항목

3.5.1. 임상생화학/ 혈액학적 검사

- (1) P 동물에서 전신에 미치는 영향을 검사한다. 각 용량 투여군에서 종결시점에 무작위 선택된 10 마리의 P 수컷과 암컷의 정해진 부위에서 공복 혈액 표본을 채취하고 적절한 장소에서 보관한다. 혈액학, 임상 생화학, T4 및 TSH 분석 또는 필요한 기타 시험을 실시한다. 헤마토크릿, 헤모글로빈 농도, 적혈구 수, 총 백혈구 수와 분화 백혈구 수, 혈소판 수 및 혈액 응고 시간/잠재력 등의 혈액학적 지표를 검사한다. 혈장 또는 혈청의 검사에는 포도당, 총 콜레스테롤, 요소, 크레아티닌, 총 단백질, 알부민 및 간세포 영향을 나타내는 적어도 두 가지 효소(예를 들면, 알라닌 아미노기 전이효소, 아스파테이트 아미노기 전이효소, 알칼리 포스파타아제, 감마 글루타밀 트랜스 펩티다제 및 솔비톨 탈수소 효소)를 포함한다. 추가 효소 및 담즙산의 측정은 특정 상황에서 유용한 정보를 제공할 수 있다. 기존의 반복 투여 시험 자료에서 시험물질에 의해 영향을 받지 않는다는 것을 나타내지 않는 한, 시험 종료 전에 소변검사가 이루어져야 하며 외형, 부피, 삼투 혹은 비중, pH, 단백질, 포도당, 혈액과

혈구, 세포 잔여물 등의 지표를 평가한다. 소변을 채취하여 시험물질 및/또는 대사산물 배설을 분석할 수도 있다.

- (2) F1 동물에서도 전신 영향을 평가한다. 각 용량 투여군에서 종결시점에 무작위 선택된 10 마리의 코호트 1A 수컷과 암컷의 정해진 부위에서 공복 혈액 표본을 채취하고, 갑상선 호르몬(T4과 TSH)을 포함한 표준 생화학 검사, 총 분화 백혈구 수와 적혈구의 수를 포함한 혈액학적 검사 및 소변 분석을 수행한다.
- (3) 생후 4 일의 잔여 새끼들을 부검하거나, 혈청 갑상선 호르몬을 측정할 수도 있다.

3.5.2. 정자 지표

- (1) 정자 지표가 90 일간의 시험에서 영향을 받지 않는다는 기존 자료가 없다면, 본 시험에서 모든 P 세대 수컷의 정자 지표를 측정한다. 모든 코호트 1A 수컷에서 정자 지표 검사를 실시한다.
- (2) 시험 종료 시, 모든 P 및 F1 (코호트 1A) 수컷에 대해 고환 및 부고환 중량을 기록한다. 적어도 한 개의 고환과 부고환을 조직병리학적 검사에 이용한다. 남은 부고환은 부고환 꼬리 부위 정자 잔여물(Cauda epididymis sperm reserves)의 산출을 위해 사용한다.
- (3) 부고환 꼬리부(Cauda epididymis) 또는 정관(Vas deferens)의 정자를 손상을 최소화하는 방법으로 수집하여, 정자 운동성 및 형태학적 평가를 수행한다.

3.5.3. 병리학적 검사

3.5.3.1. 일반 부검

- (1) 처사 시 또는 조기 사망 시 모든 P 및 F1 동물을 부검하고 구조상의 이상이나 병리학적 변화를 육안으로 검사한다. 생식계 기관에는 특별히 주의한다. 죽어가는 상태에서 안락사 시킨 동물과 죽은 동물을 기록하며, 가능한 결함 혹은 사망 원인을 검사하고 보존해야 한다.
- (2) 성체 P 및 F1 암컷의 경우, 검시 당일에 질 도말을 검사하여 성 주기의 단계를 결정하고 생식 기관의 조직 병리학과 상관을 정립한다. 모든 P 암

컷(및 해당되는 경우 F1 암컷)의 자궁은 조직 병리학적 평가에 영향을 주지 않도록 착상 부위의 존재 및 수를 검사한다.

3.5.3.2. 장기 무게 및 조직 보존

치사 시, 모든 P 동물들과 F1 성체 및 이유동물(코호트 1A, 1B, 2A 및 2B 및 코호트에 포함되지 않은 동물)에게서 수집 및 측정, 보존되어야 하는 장기는 부록 2에 수록하였다.

3.5.3.3. 조직 병리학적 검사

치사 시, 모든 P 동물들과 F1 성체 및 이유동물(코호트 1A, 1B, 2A 및 2B)에게서 수행되어야 하는 조직병리학적 검사는 부록 3에 수록하였다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과

1.1. 시험결과의 처리

- (1) 동물 개개의 결과를 제공하며, 모든 자료는 표 형식으로 요약한다. 적절한 경우 각 시험군 및 각 세대에 대해 다음 사항을 보고한다. 시험 시작 시 동물 수, 시험 중 죽은 채 발견되거나 안락사한 동물 수, 사망 또는 안락사 시간, 가임 동물의 수, 수태한 암컷 수, 독성 징후가 있는 동물의 수, 발병 시간, 지속 기간, 독성 영향의 심각성을 포함해 독성에 대한 기술을 포함한다.
- (2) 수치 결과는 적절하고 일반적으로 적용되는 통계적 방법으로 평가한다. 통계적 방법은 시험의 설계 단계에서 선택한다. 보고서에는 분석 방법 및 사용된 컴퓨터 프로그램에 대한 충분한 정보가 포함되어야 하며, 따라서 독립적인 검토자/통계 전문가가 분석을 평가/재평가할 수 있다.

1.2. 시험결과의 평가

부검 및 현미경 소견을 포함하여 관찰된 영향에 대해 평가한다. 평가는 심한 병변을 포함한 이상의 심각성, 발생 빈도 및 존재여부 간의 관계 또는 결핍을 포함한

다. 표적 기관, 번식능, 임상적 이상, 생식과 한배새끼 기능, 체중 변화, 사망률 및 기타 독성 및 발달 영향도 평가한다. 성별 특이적인 변화에는 더 주의를 기울인다. 시험결과를 평가할 때, 시험물질의 물리화학적 성질, 그리고 가능하다면, 모유를 통한 이행이나 태반 이행을 포함한 독성동태학 자료가 고려되어야 한다.

1.3. 시험결과의 해석

- (1) 확장 1 세대 생식 독성 시험은 필요에 따라 생식주기의 모든 단계에서 물질에 반복적으로 노출되는 영향에 대한 정보를 제공한다. 특히, 이 시험은 생식기관에 대한 정보와 차세대의 발달, 성장, 생존 및 기능적 종말점에 대한 정보를 생후 90 일까지 제공한다.
- (2) 시험 결과의 해석에 있어 물리화학적, 독성동태학 및 독성동력학적 특성, 구조 유사체의 사용가능한 관련정보, 시험물질의 과거에 수행된 독성시험의 결과를 포함한 물질의 모든 사용 가능한 정보를 고려해야 한다. 가능하다면 부검과 장기 중량 검사는 다른 반복 투여 시험에서 나타난 관찰의 맥락에서 평가되어야 한다. 차세대 성장의 감소는 시험물질이 모유 조성에 미치는 영향과 관련하여 고려될 수 있다.
- (3) 코호트 2의 결과 해석에 있어, 신경 행동학적 및 신경 병리학적 결과는 전문가 판단에 의한 가중치 접근법을 사용하여 모든 결과의 맥락에서 해석한다. 행동 또는 형태학적 소견뿐만 아니라 가능하다면 용량 반응의 증거를 논의한다. 인체 역학 시험 또는 사례보고 및 동물 실험(예를 들면, 독성 동태 자료, 구조 활성 정보, 기타 독성 시험 자료)을 포함한 발달 신경독성 평가를 포함한다. 결과 평가에는 생물학적 및 통계적 유의성에 대한 토론을 포함한다. 평가는 관찰된 신경 병리학적 및 행동적 변화 사이의 관계를 포함해야 한다.
- (4) 코호트 3의 결과 해석에 있어, TDAR(T-세포 의존 항체 반응)에 의해 평가된 면역 기능의 억제 또는 증진은 모든 관찰의 맥락에서 평가한다. TDAR 결과의 중요성은 면역학적으로 관련된 지표(예를 들면, 골수 세포질, 림프계 조직의 무게 및 조직 병리학, 림프구 부분 집합 분포)에 대한 기타 효과에 의해 뒷받침될 수 있다. TDAR에 의해 확립된 효과는 낮은 노출 농도에서 관찰된 다른 독성의 경우에는 의미가 없을 수 있다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 P, F1, F2 동물들에게서 얻어진 다음의 항목을 포함한다.

2.1. 시험물질

- (1) 물질자료(출처, 순도, 로트 번호 등)
- (2) 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도 등)
- (3) 독성동력학적, 독성동태학적 특성

2.2. 용매

물 이외의 용매를 사용한 경우, 논리적 근거

2.3. 실험동물

- (1) 동물의 종/계통
- (2) 동물의 수, 주령, 성별
- (3) 구매처, 사육환경, 사료, 깔짚 재료 등
- (4) 동물의 체중 범위, 군별 평균 및 표준편차를 포함하여, 시험시작 및 종료 시의 동물의 개별 중량
- (5) 투여 시작 전 P 암컷의 질 도말 자료(해당 기간에 자료가 수집된 경우)
- (6) 교배 성공과 수컷 및 암컷 파트너를 나타내는 P 세대 교배 기록
- (7) 한배새끼(Litter)들의 성체 F1세대 동물에 대한 기록

2.4. 시험조건

- (1) 투여용량선정에 대한 이론적 근거
- (2) 시험물질 제형/사료 조제내용, 최종농도
- (3) 시험물질의 투여 내용에 대한 세부사항
- (4) 실제 투여량(mg/kg/일) 및 해당 시 사료/음용수 시험물질 농도(ppm)로부터 실제 투여량으로의 환산계수
- (5) 사용 및 보관 조건에 따라 매체(예를 들면, 사료 또는 음용수), 혈액 또는 모유에서의 제제의 안정성 및 균질성

- (6) 사료 및 물 세부 사항(가능한 경우, 사료 구성 포함)
- (7) 시험군에서 도태될 새끼를 고르기 위한 무작위 과정

2.5. 결과

- (1) P 및 F1 동물에 대한 사료와 음용수 섭취, 사료 효율성(동거 기간 및 수유기를 제외하고 섭취 한 사료 1 g 당 체중 증가량) 및 시험물질 섭취량(사료/음용수 투여의 경우)
- (2) 흡수 자료(사용 가능한 경우)
- (3) P 동물에 대한 체중 자료
- (4) 이유 후, 선택된 F1 동물에 대한 체중 자료
- (5) 시험 기간 동안의 사망 시간 또는 동물이 생존하여 종결 되었는지 여부
- (6) 임상 관찰의 특징, 심각성 및 기간(가역적 여부 무관)
- (7) TSH 및 T4를 포함한 혈액학, 소변 검사 및 임상 화학 자료
- (8) 비장 세포의 표현형 분석(T-, B-, NK-세포)
- (9) 골수 세포질
- (10) 독성 반응 자료
- (11) 비정상적인 성 주기 및 주기 지속 기간을 가진 P 및 F1 암컷의 수
- (12) 교배까지 걸리는 시간(선행 기간, Pairing과 Mating 사이의 일 수)
- (13) 교배(Mating), 수태, 분만, 수유, 수컷 유도 수태, 난산이나 분만 지연, 어려움의 징후가 있는 암컷의 수와 퍼센트가 포함된 생식에 대한 독성 혹은 다른 영향
- (14) 수태 기간 및 가능한 경우, 분만 기간
- (15) 착상 횟수, 한배새끼 크기 및 수컷 새끼 수의 비율
- (16) 착상 후 손실, 정상 출산 및 사산의 수 및 비율
- (17) 한배새끼(Litter) 무게와 새끼(Pup) 체중 자료(수컷, 암컷 및 조합), 확인된 경우 미숙아 수
- (18) 전반적 육안 이상이 있는 새끼 수
- (19) 출생 후의 성장, 생존력 등에 대한 차세대 독성 또는 기타 영향
- (20) 새끼 및 기타 출생 후의 발달 자료의 물리적 지표에 대한 자료

- (21) F1 동물의 성적 성숙에 관한 자료
- (22) 해당되는 경우, 새끼와 성체의 기능 검사 자료
- (23) P 와 F1 성체 동물들의 안락사 시 체중과 절대 및 상대 기관 무게 자료
- (24) 부검결과
- (25) 모든 조직 병리학적 결과의 자세한 기술
- (26) 총 부고환 꼬리부 정자 수, 점진적 운동성 정자의 백분율, 형태학적으로 정상적인 정자의 퍼센트 및 P 및 F1 수컷의 각 확인된 이상 정자의 백분율
- (27) P 및 F1 암컷의 난소에 함유된 여포의 수 및 성숙 단계
- (28) F1 암컷 난소에서의 황체 산출
- (29) 적절한 경우 결과의 통계 처리

2.6. 코호트 2 지표

- (1) 관찰을 표준화하기 위한 절차와 점수 관찰의 정의 절차에 대한 자세한 기술
- (2) 사용된 모든 시험 절차 목록 및 사용을 위한 기술
- (3) 정보와 자동화된 기구의 기술을 포함한 사용된 행동/기능적, 신경병리학적 및 형태학적 절차의 기술
- (4) 시험 절차에서 장치의 동등성 및 투여군의 균형을 교정하고 보장하기 위한 절차
- (5) 전문적인 판단과 관련된 모든 결정에 대한 기술의 간단한 정당화
- (6) 성별과 용량 투여군 별 모든 행동/기능, 신경 병리학적 및 형태학적 결과에 대한 자세한 기술. 대조군의 증가와 감소 포함
- (7) 두뇌 무게
- (8) 신경학적 징후 및 병변에서 파생된 모든 진단(자연 발생 질환 또는 상태 포함)
- (9) 표본 소견의 이미지
- (10) 형태계측 분석에 사용되는 조직표본의 상동성을 평가하는 저배율(Low-power) 이미지
- (11) 중요성에 상관없이 자료와 결과를 분석하기 위해 사용된 통계적 모델을 포함하는 결과의 통계적 처리

- (12) 시험물질의 신경독성학적 잠재성에 대한 다른 독성 효과와의 관계(성별 및 용량 투여군 별)
- (13) 결과에 대한 독성동력학적 정보 중요성
- (14) 시험 방법의 신뢰성 및 감수성을 지지하는 자료(즉, 양성 및 과거 대조군 자료)
- (15) 신경 병리학적 및 기능적 효과 사이의 관계
- (16) 어미 및 차세대에 대한 무영향관찰용량 또는 기준 용량(성별 및 용량 투여군 별)
- (17) 화학물질이 발달 신경독성을 일으켰는지 여부와 무영향관찰용량을 포함한 결과를 기반으로 한 자료의 전반적인 해석에 대한 논의

2.7. 코호트 3 지표

- (1) 혈청 IgM 항체 역가(SRBC 또는 KLH에 대한 감작) 또는 비장 IgM PFC 단위 (SRBC에 대한 감작)
- (2) 실험실이 처음 수행하는 경우이거나, 주기적인 검증의 경우, TDAR 방법의 수행정도를 확인
- (3) 화학물질이 발달 면역독성을 일으켰는지 여부와 무영향관찰용량을 포함한 결과를 기반으로 한 자료의 전반적인 해석에 대한 논의

2.8. 결과 고찰

2.9. 부모와 차세대에 대한 효과의 무영향관찰용량 값을 포함한 결론

2.10. 시험 중에 확보되지 않았더라도 결과의 해석에 유용한 모든 정보

부록 1

통합 기능 검사(Functional Observational Battery)에 포함되는 관측치와 측정치(코호트 2A)

원래의 사육 케이지 및 시험구역에서의 기능	조작 기능	생리적 기능
자세	놓아주기 쉬운 정도	온도
무의식적 강직/간대 긴장	다루기 쉬운 정도	체중
안검폐쇄	근육 긴장	동공반응
입모	접근 반응	동공크기
타액분비	터치 반응	
유루증	소리반응	
발성	꼬리 핀치 반응	
양육	바로잡기 반응(Righting Response)	
걸음걸이 이상	Landing Foot Splay	
각성	앞발 악력	
강박관념	뒷발 악력	
이상한 행동		
계통		
호흡이상		

부록 2

- (1) 치사 시, 아래 나열된 관련 코호트의 모든 P 동물들과 F1 동물들의 체중과 수분 포함 기관 무게를 절개 직후 바로 측정한다. 이 기관은 적절한 조건 하에서 보존해야 한다. 명시되지 않는다면 쌍을 이룬 장기는 수행 실험실의 일반적인 관행과 일치하게 개별적으로 칭량되거나 또는 결합될 수 있다.
- 자궁(난관과 자궁 경부 포함), 난소
 - 고환, 부고환(정자 계수에 사용된 표본의 전체와 꼬리부)
 - 전립선(외측 및 복부 부분 결합). 전립선 복합체를 다듬을 때는 체액이 가득 차 있는 정낭에 구멍이 나지 않도록 주의한다. 총 전립선 중량에 대한 투여와 관련된 효과가 있는 경우, 등 옆 부분, 배 부분은 고정 후 조심스럽게 해부하며, 별도로 무게를 측정해야 한다.
 - 응고선(Coagulating glands)과 그들의 체액이 있는 정낭(한 단위로)
 - 뇌, 간, 신장, 심장, 비장, 흉선, 뇌하수체, 갑상선(고정 후), 부신 및 알려진 표적 기관 또는 조직
- (2) 위에 나열된 기관 외에 말초 신경, 근육, 척수, 눈과 시신경, 위장관, 방광, 폐, 기관(갑상선과 부갑상선이 연결된 상태), 골수, 정관(수컷), 유선(수컷과 암컷)과 질은 적절한 조건 하에서 보존해야 한다.
- (3) 코호트 1A 동물은 조직 병리학적으로 모든 기관의 무게를 측정하고 보존한다.
- (4) 출생 전후에 유발된 면역 독성 영향을 조사하기 위해, 수컷 10 마리와 암컷 10 마리 코호트 1A 동물들(각 코호트는 무작위로 선택된 한배새끼 당 1 마리 수컷 혹은 1 마리 암컷으로 구성하여, 적어도 1 마리의 새끼가 모든 한배새끼들을 대표하도록 함)에서 치사 시에 다음 검사를 수행한다.
- 노출 경로로부터 연관되거나 먼 곳의 림프절 칭량(추가로 코호트 1A 동물들에서 수행되었던 부신, 흉선, 비장의 칭량)
 - 비장 절반을 사용한 비장 림프구의 소집단 분석(CD4+, CD8+ T 림프구, B 림프구, NK세포)
- 코호트 1A 동물에서 비장의 림프구 소집단을 검사함으로써, 시험물질의 투여가 암세포나 병원체에 반응하는 CD4+, CD8+ T 림프구, B 림프구, NK세포 구성에 영향을 주는지 평가할 수 있다.

(5) 코호트 1B 동물에서 다음과 같은 기관의 무게를 측정하고 해당 조직을 블록 단계(Block stage)까지 처리해야 한다.

- 질(무게 측정하지 않음)
- 자궁 경부와 자궁
- 난소
- 고환(적어도 하나)
- 부고환
- 정낭과 응고선
- 전립선
- 뇌하수체
- 확인된 표적 기관

코호트 1B의 조직 병리학적 검사는 1A의 결과가 모호하거나 생식 또는 내분비 독성 물질로 의심될 경우 수행한다.

(6) 코호트 2A 및 2B의 경우, 발달 신경독성 검사(생후 21 일 또는 22 일 및 성체 차세대)를 수행한다. 코호트 2A 동물들은 신경 독성 평가를 위한 뇌 무게 기록과 전체 신경조직 병리학적 검사, 행동 시험 후에 치사된다. 코호트 2B 동물은 생후 21 일 또는 22 일에 치사되는데, 뇌 무게가 기록되고 신경 독성 평가의 목적으로 뇌의 현미경 검사가 수행된다. 관류 고정(Perfusion fixation)은 코호트 2A 동물에게는 필요하고 코호트 2B 동물에게는 선택 사항이다.

(7) 미숙아(Runts)를 포함해 코호트에 선택되지 않은 동물에게서 더 이상 생애-조사(Life investigations)가 필요하지 않다면, 이유 후(생후 22 일)에 안락사시킨다. 이에 해당하는 새끼들은 생식 기관 평가를 포함하여 일반 부검을 받게 된다. 가능하면 많은 성별 및 투여군 당 10 마리까지의 새끼의 뇌, 비장, 흉선을 칭량하고 적절한 상태에서 보관한다. 또한, 이러한 암컷 및 수컷 새끼의 유방 조직은 더 미세한 분석을 위해 보존될 수 있다. 전반적인 비정상 부위와 표적 조직은 조직검사를 위해 저장해야 한다.

부록 3

- (1) 모든 고용량 투여군 및 대조군 P 동물에 대해 부록 2의 (1) 및 (2)에서 제시된 장기의 전체 조직 병리학적 시험이 수행된다. 무영향관찰용량 값의 결정을 위하여 가장 낮은 용량의 투여군의 모든 동물에서 투여와 연관된 변화를 보이는 장기를 검사해야 한다. 또한 수태능 감소(예를 들면, 짝짓기, 수태, 부모 되기, 건강한 차세대 분만에 실패하거나 성 주기, 정자 수, 운동성, 혹은 형태학적 이상)한 것으로 의심되는 모든 동물의 생식기관에 대해 조직 병리학적 검사를 수행한다.
- (2) 모든 고용량 및 대조군 성체 코호트 1A 동물들에 대해 부록 2의 (1) 및 (2)에 열거된 장기의 전체 조직 병리학이 수행된다. 한배새끼들은 성별 당 최소 1 마리의 새끼로 대표되어야 한다. 무영향관찰용량 결정을 돕기 위해 저용량 투여군의 모든 동물들은 투여 관련 변화 및 모든 심한 병변을 나타내는 장기와 조직을 검사한다. 코호트 1A의 모든 동물에서 수행된 흉선, 비장, 부신의 조직병리학적 검사와 함께, 수컷 10 마리와 암컷 10 마리에 대해서는 림프절 기관에 대한 산전 및 산후 유발 효과의 평가를 위해 수집된 림프절과 골수의 조직병리학적인 검사를 수행한다.
- (3) 생식 및 내분비 독성이 있다고 추정되면 부록 1의 (5)에서 기술된 대로 블록 단계(Block stage)까지 가공되고 코호트 1B의 모든 동물에서부터 유래된 생식 및 내분비 조직에 대해 조직병리학적인 검사를 한다. 코호트 1A의 결과가 모호한 경우 코호트 1B도 조직 검사를 수행한다.
- (4) 성체 암컷의 난소에는 원시 난포와 성장하는 난포뿐만 아니라 황체가 있어야 한다. 따라서 조직 병리학적 검사는 F1 암컷에서 황체뿐만 아니라 원시의, 작게 자란 여포까지도 검출하는 것을 목표로 한다. 동물의 수, 난소 표본 부위 선택, 표본 부분 샘플 사이즈는 사용되었던 평가기준에 통계학적으로 적절해야 한다. 여포 수 측정은 우선 대조군과 고용량 동물에서 수행하며 후에 부작용이 발생할 경우 더 낮은 용량에서도 검사한다. 검사는 투여군 난소와 대조군 난소를 비교하기 위해 성장하는 여포와 결합할 수 있는 원시 여포 수의 계수를 포함한다. 황체 평가는 성 주기의 단계가 평가에서 고려될 수 있도록 성 주기 시험과 병행하여 수행한다. 난관, 자궁 및 질은 적절한 기관 특이적인 발달을 알아보기 위해 검사한다.

- (5) 자세한 고환 조직 병리 검사는 고환의 분화 및 발달과 정자생성에 대한 투여와 연관된 효과를 확인하기 위해 F1 수컷들에서 실시한다. 가능하다면 고환의 망상부분(Rete testis)을 검사한다. 부고환 두부(머리), 몸통, 꼬리와 정관은 적절한 기관 특이적인 발달뿐만 아니라 P 수컷에게 필요한 지표로 검사한다.
- (6) 신경 병리학적 검사는 신경 행동 검사 완료 후(생후 75 일 이후, 생후 90 일을 초과하지 않음) 성별 당 모든 고용량 및 대조군 코호트 2A 동물들에 대해 수행한다. 뇌 조직 병리학적 검사는 생후 21 일 또는 22 일에 성별로 모든 고용량 및 대조군 코호트 2B 동물들에 대해 수행한다. 무영향관찰용량 결정을 돕기 위해 투여와 관련된 변화를 나타내는 장기 또는 조직을 저용량 투여군 동물에서 검사한다. 코호트 2A 및 2B 동물의 경우, 후 신경구, 대뇌피질, 해마, 기저핵, 시상, 시상하부, 중뇌, 뇌간, 소뇌까지 검사한다. 코호트 2A에 대해서만, 눈(망막 및 시신경) 및 말초 신경, 근육 및 척수 샘플을 검사한다.
- (7) 형태적(Morphometric) 평가는 뇌의 대표 영역(신뢰할 수 있는 미세한 경계표를 기반으로 신중하게 선정된 부분)에서 수행하며 특정 뇌 영역의 선형 혹은 면 측정을 포함할 수 있다. 준비된 모든 동물(10 마리/성별/투여군)을 표본으로 채취하는 것이 목표이지만, 더 적은 수를 사용하는 것도 가능하다. 그러나 6 마리/성별/투여군 수준의 시료는 일반적으로 시험법의 목적에 충분하지 않다. 조직 고정에서부터 조직 절개, 조직 샘플의 해체, 조직 가공, 슬라이드 염색을 통한 조직 샘플 준비의 모든 과정에 각 시험군의 대표 샘플이 포함되도록 한다. 고정액에서의 장기 저장으로 인한 수축을 피하기 위해 형태학 또는 입체 분석을 위한 투여군의 뇌 조직을 동시에 적절한 배지에 삽입한다.

제52항 만성 독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 실험동물의 수명에 해당하는 기간의 대부분의 기간 동안에 시험물질을 반복적으로 투여한 후 이로 인해 나타나는 건강유해성 정보를 생산하는 데 목적이 있다.

II. 시험

1. 원리

이 시험은 일반적으로 12 개월 동안 실험동물에 단계적 용량으로 시험물질을 매일 투여한 후, 체중, 사료/음용수 섭취, 혈액학적 검사, 임상생화학적 검사, 조직병리학 적 검사 등을 통해 시험물질의 만성영향을 평가한다. 화학물질의 만성독성 규명, 표적장기의 확인, 용량-반응 상관성, 무영향관찰용량, 작용기전 연구 등을 통해 인 체노출수준에서의 만성독성영향을 예측하는 것을 목표로 한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

2.1.1. 동물종의 선정

이 시험은 기본적으로 설치류를 사용하며 마우스를 사용할 수도 있으나 랫드를 가장 우선적으로 사용한다. 랫드는 일반적으로 사용되는 계통의 젊고 건강한 성체를 사용하며 이 시험보다 단기간의 독성시험에서 사용된 것과 동일한 동물 계통을 사용한다. 암컷은 출산의 경험이 없고 임신하지 않은 상태여야 한다.

2.1.2. 사육 및 사료 공급 조건

(1) 동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C}(\pm 3^{\circ}\text{C})$ 를 유지하며, 상대습도는 30 % 이상, 70 %를 초과하지 않는 것이 좋고 평상시는 50 % ~ 60 %를 유지하도록 한다. 조명은 인공조명을 사용하되 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.

- (2) 사료와 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 무제한으로 충분히 공급하도록 한다. 사료는 시험에 사용되는 종의 모든 영양학적 조건을 충족해야 하며, 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 오염물질의 함량은 가능한 낮은 수준이어야 한다.

2.1.3. 동물 수와 성별

암수 모두 사용하며 시험이 끝날 때마다 생물학적 및 통계학적 평가를 하는 데 필요한 충분한 수의 동물을 사용한다. 설치류의 경우, 일반적으로 각 용량 수준에서 군 당 암수 각각 20 마리 이상의 동물을 사용하며 비설치류인 경우 군 당 암수 각각 최소 4 마리를 사용할 것이 권장된다.

2.1.4. 동물의 준비

- (1) 이전에 다른 시험과정에 사용된 바 없는 건강한 8 주령 이내의 동물을 사용하며 최소 7 일 동안 실험실 환경에 미리 순화시킨다.
- (2) 시험동물은 종, 계통, 근원, 성별, 체중 및 나이를 고려한다. 시험을 시작하는 시점에서 시험에 사용할 암수 동물의 체중은 시험에 사용하는 모든 동물의 평균 무게의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 대조군과 투여군의 시험동물은 무작위로 배정하도록 한다.
- (3) 각 동물에게 고유한 식별 번호를 부여하고 문신, 마이크로 칩 삽입 또는 기타 적절한 방법으로 식별 번호가 지워지지 않아야 한다.

2.2. 중간 부검군, 회복군 및 질병 모니터링군

2.2.1. 중간 부검군

독성 변화 및 작용기전에 관한 정보를 얻기 위해 6 개월 시점에 해당하는 중간 부검군(최소 10 마리의 동물/성/군)을 둘 수 있다. 이러한 정보가 이미 이전에 수행된 반복투여독성시험에서 얻을 수 있는 경우라면, 중간 부검군을 두지 않을 수도 있다.

2.2.2. 회복군

시험대상 화학물질에 의해 유발된 독성학적 변화가 회복되는지 그 가역성을 모니터링하기 위해 회복군을 둘 수도 있다. 이들 군은 정상적으로는 고용량 시험군과 대조군으로 제한된다.

2.2.3. 질병모니터링군

필요하다면 시험 중 질병 상태를 모니터링하기 위해 추가적으로 질병모니터링군 (일반적으로 암수 각각 5 마리)을 포함시킬 수도 있다.

3. 시험방법

3.1. 투여군 및 투여용법

한계시험이 수행되는 경우를 제외하고는 최소 3 단계 용량의 투여군과 대조군을 둔다. 만성독성시험에서의 용량은 일반적으로 단기간반복투여시험 또는 용량설정시험 결과를 바탕으로 결정한다. 시험물질 또는 관련 물질에 대한 기존의 독성 및 독성동태 자료를 최대한 활용하며 다음의 사항을 고려한다.

- (1) 용량을 선정할 때에는 해당 용량에서 얻은 시험 자료가 OECD 국가 간의 규제 요건(예, 유해 및 위해성평가, 분류 및 표지, 내분비계 장애평가 등)에 적절한지를 고려하여야 한다.
- (2) 동물에게 고통을 주거나 심각한 독성, 질병 또는 사망을 초래하지 않는 범위 내에서 최고용량을 선택하며 체중증가의 감소분이 10 % 정도 나타나는 용량을 최고용량(Highest dose)으로 한다.
- (3) 시험의 목적에 따라서는 시험물질에 대한 악영향을 나타내면서도 수명이나 체중에는 전혀 영향을 미치지 않는, 최고용량보다는 한 단계 낮은 고용량(Top dose)을 선정할 수도 있다. 고용량은 1,000 mg/kg을 초과하지 않아야 한다(한계용량).
- (4) 용량 및 용량간격은 용량-반응이 나타나는 범위에 들도록 설정하며, 저농도는 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) 또는 기준용량(BMD, Bench Mark Dose)을 설정할 수 있는 수준으로 설정되어야 한다.

- (5) 용량간격은 시험 물질의 특성에 따라 다르며, 최고용량(고용량)을 기준으로 저용량을 설정할 때는 공비 값 2 ~ 4를 적용하는 것이 좋다.
- (6) 용량 선택 시 아래 사항을 고려하여야 한다.
- 용량-반응 곡선에서 알려진 또는 예상되는 비선형성 또는 변곡점
 - 독성동태자료, 그리고 외부용량과 내부용량 간에 대사활성의 유도, 포화 또는 비선형성이 발생하거나/발생하지 않는 용량범위
 - 병변으로 발전될 전조, 영향지표, 또는 핵심적인 생물학적 반응과정의 지표
 - 세포 독성이 발생하기 시작하는 용량, 호르몬 농도의 교란이 발생하는 용량, 항상성 작용기전이 급격히 깨어지는 용량 등 작용기전의 주요 사항
 - 벤치마크용량의 예측 값 또는 역치의 범위 등 특히 그 값을 정확히 알아야 하는 범위에서의 용량-반응 곡선의 영역
 - 예상되는 인체 노출 수준
- (7) 대조군은 아무 물질도 처리하지 않은 무처리군으로 두거나 시험물질 투여 시 용매를 사용하였다면 이 때 사용한 용매를 투여한다. 시험물질을 처리하는 것을 제외하고는, 대조군의 동물은 처리군의 동물과 동일한 방식으로 취급한다. 용매를 사용하는 경우, 투여군에서 최고용량으로 사용한 용매의 양을 대조군에도 동일하게 처리한다.
- (8) 1,000 mg/kg에서 부작용을 일으키지 않을 것으로 예상된다면 군이 본 시험에서 3 단계 용량군 모두를 두지 않아도 된다. 인체노출량이 매우 커서 1,000 mg/kg/day 용량 이상으로 시험해야 할 필요성이 제기되는 경우를 제외하고는 1,000 mg/kg/day를 한계용량으로 사용하여 시험할 수도 있다.

3.2. 용량조제 및 시험물질 투여

시험 물질은 일반적으로 사료, 음용수 또는 위관투여법을 통해 경구로 투여한다. 투여 경로와 방법은 시험 목적, 시험 물질의 물리적/화학적 특성, 생체 이용률, 인간의 주요 노출경로와 노출 방법에 따라 결정한다. 선택된 경로와 투여 방법에 대해서는 논리적 근거가 제시되어야 하며 다음의 사항을 고려하여 결정한다.

- (1) 필요한 경우, 시험 물질을 적절한 용매에 녹이거나 현탁시킨다. 용매를 선정할

때에는 수용액/현탁액을 우선 고려하며 그 다음으로 오일용액/유탁액을, 그 다음으로는 다른 가능한 용매를 고려한다.

- (2) 사료나 음용수를 통해 투여되는 물질의 경우 시험 물질의 양이 정상적인 영양 균형 또는 물 균형을 저해하지 않는지 확인하는 것이 중요하다. 시험물질을 사료에 혼합하여 투여하는 경우, 총 사료의 5 %의 상한선을 초과하지 않아야 한다.
- (3) 경구투여의 경우, 시험물질은 매일 투여하며(주 당 7 일), 규제기관의 요건에 따라 12 개월보다 더 장기간의 투여기간을 정해놓을 수도 있지만 일반적으로 12 개월 동안 투여한다. 경피투여의 경우 1 일 6 시간, 주 7 일 일정으로 12 개월 동안 투여한다. 흡입경로의 경우 1 일 6 시간, 주 7 일 일정으로 12 개월 동안 투여한다. 경구 또는 흡입경로의 경우 논리적 근거가 있는 경우 주 5 일 투여가 가능하다.
- (4) 시험물질이 국소자극제인 경우 하루 2 번으로 분할 투여가 가능하며 이때 1 일 투여량을 유지해야 한다. 투여량이 일정한 부피가 되도록 농도를 조절하여 투여액량을 동일하게 하여야 한다. 심각한 자극을 피하기 위해 시험물질을 희석하여 사용할 필요가 있다. 분할 투여의 경우 한 번에 투여할 투여액량의 최대량은 동물의 크기에 달려 있지만 일반적으로 설치류의 경우 100 g 체중 당 1 mL를 초과하지 않아야 한다.

3.3. 시험기간

- (1) 본 시험지침은 특정 규제기관의 규정에서 정한 바에 따르거나, 또는 작용기전 연구목적을 위해서는 더 짧은 기간(예: 6 개월 또는 9 개월) 또는 더 긴 기간(예: 18 개월 또는 24 개월)의 시험에도 적용할 수 있다. 다만, 이 경우 적절한 논리적 근거를 제시 한다.
- (2) 시험물질에 의해 유도된 독성변화의 가역성을 모니터링하기 위한 회복군의 경우 투여중단 후 4 주 이상 그리고 총 시험기간의 1/3 이하의 기간 동안 투여하지 않은 상태로 한다.

3.4. 관찰

- (1) 주말과 공휴일을 포함하여 매일 시험업무의 시작과 종료 시에 모든 동물에 대하여 질병이나 사망여부를 확인하며 효과가 최대로 나타나는 시점을 고려하여 하루에 적어도 한 번, 동일 시간대에 일반 임상변화에 대한 관찰을 실시한다.
- (2) 첫 번째 노출 이전(동물 내 비교를 가능하기 위함), 시험 첫 주가 끝나는 날, 그리고 그 후에는 매달 모든 동물에 대해 상세한 임상관찰을 실시한다. 관찰하는 임상증상은 피부, 모피, 눈, 점막, 분비물 및 배설물의 발생 및 자율 신경계 활동(예: 눈물샘, 눈꺼풀 처짐, 동공 크기 및 비정상적인 호흡 패턴)을 포함하되 그 외의 임상관찰사항도 가능한 측정할 필요가 있다. 걸음걸이, 자세 및 촉감에 대한 반응, 간헐적인 경련성 운동 또는 긴장성 운동, 상동증(예: 과도한 털 손질, 반복적인 선회) 또는 기괴한 행동(예: 자해, 뒤로 걷기)도 기록한다.
- (3) 시험물질을 첫 번째 투여하기 전에 검안경이나 기타 적절한 장비를 사용하여 모든 동물에 대해 눈 검사를 실시한다. 시험 종료 시에는, 모든 동물에 대해 눈 검사를 실시하는 것이 좋으며, 적어도 고용량 및 대조군에서는 반드시 실시한다.
- (4) 이전에 수행한 28 일 반복투여독성시험 및 90 일 반복투여 독성시험 결과, 신경 독성 영향을 유발할 가능성이 있는 화학 물질의 경우에는 다른 유형의 자극(예: 청각, 시각 및 고유 감각 자극)에 대한 감각 반응, 악력 평가 및 운동 활동을 선택적으로 평가할 수도 있으며, 평가는 시험 시작 전, 시험 시작 후 3 개월까지, 그리고 12 개월 사이에, 또는 시험 종료 시(12 개월 이상인 경우) 수행할 수 있다.
- (5) 이전에 수행한 28 일 반복투여독성시험 및 90 일 반복투여 독성시험 결과, 면역 독성을 일으킬 가능성이 있는 화학 물질의 경우, 시험 종료 시 면역독성에 대한 추가 조사가 선택적으로 수행될 수 있다.

3.4.1. 체중, 사료/음용수 섭취, 사료 효율성

모든 동물들은 투여 시작 시, 첫 13 주 동안 최소 일주일에 한 번씩, 그 이후에는 매월 마다 체중을 측정한다. 먹이의 소비량 및 효율성 측정은 첫 13 주 동안 최소 매주, 적어도 그 이후에는 매월 실시한다. 음용수 섭취량은 시험물질을 음용수

에 섞여 투여할 때 사료와 동일한 방법으로 측정하고, 그 외 음용수 섭취량에 변화를 줄 수 있는 시험에서 고려되어야 한다.

3.4.2. 혈액학 및 임상 생화학적 검사

- (1) 설치류를 대상으로 시험하는 경우, 수컷 최소 10 마리와 암컷 최소 10 마리에 대해 3 개월, 6 개월, 12 개월 및 시험 종료 시(12 개월보다 긴 경우)에 동일한 동물에 대해 혈액 검사를 실시한다. 마우스의 경우 별도의 채혈군이 필요할 수 있다. 비설치류 시험에서는 설치류와 같은 시점에 좀 더 적은 수의 동물(개의 경우, 군 당 암수 각각 4 마리)에 대해 혈액 검사를 실시한다. 단, 설치류 및 비설치류 모두 이전에 수행된 90 일 시험에서 혈액검사 매개변수에 영향이 없는 경우 3 개월째의 검사는 수행할 필요가 없다.
- (2) 혈액학적 지표는 백혈구 수(전체 수 및 분율), 적혈구 수, 혈소판 수, 헤모글로빈 농도, 헤마토크릿(침전된 세포의 부피), 평균 혈구체적(MCV, Mean Corpuscular Volume), 평균 혈구 헤모글로빈(MCH, Mean Corpuscular Haemoglobin), 평균 혈구 헤모글로빈 농도(MCHC, Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration), 프로트롬빈 시간 및 활성화트롬보플라스틴 시간(APTT, Activated Partial Thromboplastin Time) 등을 포함한다. 아울러 하인즈 소체(Heinz body)나 다른 비정상 적혈구 형태 또는 메트헤모글로빈과 같은 다른 혈액학 지표는 시험물질의 독성에 따라 적절히 추가하여 측정할 수도 있다.
- (3) 채취한 혈액 표본에 대해 임상 생화학적 지표를 측정하여야 한다. 혈액 채취 전에 시험동물을 절식시키는 것이 좋다(마우스의 경우 제외할 수 있다.). 해당, 우레아(요소 질소), 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 칼슘, 나트륨, 칼륨, 총 콜레스테롤, 2 개 이상의 간세포 평가지표(알라닌 아미노기 전이효소, 아스파테이트 아미노기 전이효소, 글루탐산탈수소효소, 총 담즙산), 2 개 이상의 간담도 평가지표(알칼린 포스파타아제, 감마 글루타밀 전이효소, 5'-뉴클레오티다아제, 총 빌리루빈, 총 담즙산), 그 외의 지표는 시험물질의 독성에 따라 적절히 측정한다. 전반적으로 시험물질 투여에 의해 관찰 및/또는 예측되는 영향에 따라 유연한 접근 방법이 필요하다.
- (4) 소변 검사는 혈액학 및 임상 생화학 지표 측정 시험과 동일한 간격으로 채집

된 시료에 대해 군당 최소 수컷 10 마리와 최소 암컷 10 마리에 대해 실시한다. 외형, 부피, 삼투압 또는 비중, pH, 총 단백질 및 포도당, 케톤, 우로빌리노젠, 빌리루빈 및 잠혈 등을 포함하여 관측된 독성영향에 대한 조사를 확장하기 위해, 필요하다면 보다 정밀한 임상생화학 지표를 측정할 수도 있다.

3.4.3. 병리학적 검사

3.4.3.1. 일반부검

- (1) 시험에 사용된 모든 동물에 대해서는 신체의 외부 표면, 모든 구멍, 두개골, 흉부 및 복강과 그 내용물에 대해 완전하고 세밀한 검사를 실시한다.
- (2) 장기 무게는 모든 동물(죽거나 병이 발견된 것과는 별개)의 부신, 뇌, 부고환, 심장, 신장, 간, 난소, 비장, 고환, 갑상선(부갑상선과 함께 측정 후 고정), 자궁은 적절하게 부착 조직을 정돈하고 절개 후 건조 방지를 위해 가능한 한 빨리 습윤 무게를 측정한다. 마우스를 사용하는 시험에서 부신의 무게를 측정하는 것은 선택 사항이다.
- (3) 다음에 제시된 조직에 대해서는 조직 유형 확인이나 필요한 조직병리학적 검사를 위해 가장 적절한 고정 용매를 사용하여 고정시켜 둔다. 쌍을 이룬 장기의 경우 양쪽 쌍 모두를 보존한다. 심한 손상을 보이는 모든 병소, 심장, 췌장, 위(전위, 선위), 부신, 회장, 부갑상선, 대동맥, 공장, 말초신경, 고환, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 신장, 뇌하수체, 흉선, 맹장, 눈물샘, 전립선, 갑상선, 간, 직장, 응고선, 폐, 침샘, 기도, 결장, 림프절(표부와 심부), 정낭, 방광, 십이지장, 유선(암컷에서는 필수, 수컷에서는 육안 해부 가능한 경우), 골격근, 자궁(자궁경부 포함), 부고환, 피부, 눈(망막 포함), 식도, 척수(3 단계: 경부, 중흉부 및 요추), 비장, 질, 담낭(랫드 이외의 종), 난소, 골수 단면 및/또는 신선한 골수, 하더 샘 등에 대해 실시한다. 치아, 혀, 상기도(코, 비갑개 및 부비강 포함), 요관, 요도, 관절 포함 대퇴골, 후각망울, 흉골 등에 대한 조직병리학적 검사는 선택적으로 실시한다.

3.4.3.2. 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사는 최소한 다음에 제시된 조직에 대해 수행한다.

- 고용량 및 대조군의 모든 조직
- 시험 중에 죽거나 치사시킨 동물의 모든 조직
- 육안적 이상을 보이는 모든 조직
- 표적장기의 조직, 고용량군에서 시험물질과 관련한 독성 변화를 보이는 조직
- 신장, 부신과 같은 쌍을 이룬 장기의 경우에는 각 쌍의 조직

III. 시험자료 및 보고

1. 시험자료

- (1) 평가를 수행한 모든 측정 지표에 대해 개별 동물별로 시험자료를 제시한다. 독성자료는 가능한 표로 요약하여 제시한다.
- (2) 실험실에서 수행된 과거의 대조군 자료(Historical control data)는 시험의 결과를 해석하는 데 매우 중요하다.
- (3) 가능하다면, 수치 결과는 적절한 방법에 따라 통계처리를 한다. 통계 방법과 자료는 시험을 설계할 당시에 미리 선정한다.

2. 시험결과의 보고

시험의 보고서에는 다음과 같은 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질

- (1) 물리적 성질, 순도 및 물리 화학적 성질
- (2) 식별 자료
- (3) 공급처
- (4) 배치 번호
- (5) 화학 분석 증명서

2.2. 시험용매(해당되는 경우)

- (1) 시험용매 선택에 대한 타당성(물이 아닌 용매를 사용하였을 경우)

2.3. 시험동물

- (1) 사용된 종/계통 및 선정 근거
- (2) 시험 시작 시 동물의 수, 연령 및 성별
- (3) 구입처, 사육 조건, 사료 등
- (4) 시험 시작 시 동물의 개체 무게

2.4. 시험조건

- (1) 투여 경로 및 용량 선택에 대한 이론적 근거
- (2) 자료 분석에 사용한 통계 방법(있을 경우)
- (3) 시험물질 배합/사료조제에 대한 세부 사항
- (4) 시험물질 제제의 농도, 안정성 및 목표설정 농도에 대한 분석 자료
- (5) 투여 경로 및 시험물질 투여에 관한 세부사항
- (6) 흡입시험, 비부노출 또는 전신노출 여부
- (7) 실제 용량(mg/kg/day) 및 사료/음용수의 시험물질 농도로부터 실제용량을 계산하기 위한 전환계수
- (8) 사료 및 음용수에 대한 세부 정보

2.5. 결과: (요약된 표 자료 및 개별 동물 자료가 제시되어야 함)

- (1) 생존 자료
- (2) 체중 및 체중의 변화
- (3) 사료섭취, 사료 효율 계산 값(수행하였다면), 음용수 섭취량(해당되는 경우)
- (4) 성별 및 용량수준에 따른 독성반응(독성증상포함)
- (5) 임상관찰의 본질, 발생률(측정한 경우, 중증도) 및 기간(일시적인지 영구적인지)
- (6) 눈 검사
- (7) 혈액학적 검사
- (8) 임상생화학적 검사

- (9) 소변 검사
- (10) 신경독성 또는 면역 독성에 대한 조사 결과
- (11) 시험 종료 시의 체중
- (12) 장기중량(체중대비 장기 중량비)
- (13) 부검 결과
- (14) 모든 시험물질 투여에 의해 발생된 조직병리의 소견에 대한 자세한 설명
- (15) 흡수율 자료(가능한 경우)

2.6. 결과에 대한 적절한 통계 처리

2.7. 토론사항

- (1) 용량-반응 관계
- (2) 작용기전에 대한 정보
- (3) 모델링 방법(적용되었다면)에 대한 토론 내용
- (4) 벤치마크용량(BMD), 무영향관찰용량(NOAEL), 최소영향관찰용량(LOAEL, Lowest Observed Adverse Effect Level)의 결정
- (5) 시험수행기관의 과거에 수행된 대조군의 시험자료
- (6) 인체와의 상관성

2.8. 결론

제53항 만성독성/발암성 병합시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 동물종의 수명에 해당하는 기간 동안에 시험물질을 반복적으로 투여한 후 이로 인해 발생할 수 있는 만성독성 및 발암성 정보를 동시에 생산하는 데 목적이 있다.

II. 시험

1. 원리

- (1) 이 시험은 만성시험 단계와 발암성시험 단계의 두 단계가 병합되어 있다. 실험 동물로는 일반적으로 랫드를 사용하며, 만성독성 단계시험에서는 주로 12 개월, 발암성 단계시험에서는 주로 24 개월 동안 시험물질을 투여한다.
- (2) 만성독성 단계시험에서는 체중, 사료/음용수 섭취, 혈액학적 검사 및 임상생화학 적 검사, 병리학 적 검사 그리고 조직병리학 적 검사 등을 실시하여 시험물질에 의한 만성독성영향을 예측한다. 발암성 단계시험에서는 혈액학적 검사, 임상생 화학적 검사, 병리학 적 검사 및 조직병리학 적 검사 등을 실시하여 시험물질에 의한 신생물발생의 증가, 악성신생물의 발생률 증가 등 발암의 가능성을 예측하는 것을 목표로 한다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험동물

2.1.1. 실험동물의 선정

- (1) 랫드와 마우스는 비교적 수명이 짧은 점, 약리학 적 및 독성학적 시험연구에서 광범위하게 사용된 점, 종양 유도에 대한 민감성 및 종에 대한 특성이 잘 알려져 있다는 점 때문에 시험동물 모델로서 매우 선호되는 종이다. 이 시험에서는 마우스를 사용할 수도 있지만 일반적으로 랫드를 더 선호한다.

- (2) 일반적으로 사용되는 계통의 젊고 건강한 성체를 사용한다. 만성독성시험에 사용될 동물은 이 시험보다 단기간의 독성시험에서 사용된 것과 동일한 동물 계통을 사용하여야 한다. 암컷은 출산의 경험이 없고 임신하지 않은 상태여야 한다.

2.1.2. 사육 및 사료 공급 조건

- (1) 동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} (\pm 3^{\circ}\text{C})$ 를 유지하며, 상대습도는 30 % 이상이어야 하며 70 %를 초과하지 않는 것이 좋고 평상시는 50 % ~ 60 %를 유지하도록 한다. 조명은 인공조명을 사용하여 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.
- (2) 사료와 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 무제한으로 충분히 공급하도록 한다. 사료는 시험에 사용되는 종의 모든 영양학적 요구조건을 충족해야 하며, 시험결과에 영향을 미칠 수 있는 오염물질의 함량은 가능한 낮은 수준이어야 한다.

2.1.3. 동물 수와 성별

암수 모두를 사용하며 통계학적 평가가 가능하도록 충분한 수의 동물을 사용한다. 설치류의 경우, 발암성단계 시험에서는 각각의 시험군과 대조군마다 암수 각각 적어도 50 마리의 동물을 사용해야 한다. 만성독성 단계의 시험에서는 설치류의 경우 각 시험군 및 대조군에 최소 10 마리를 배정한다.

2.1.4. 동물의 준비

- (1) 이전에 다른 시험과정에 사용된 적이 없는 8 주령 이내의 건강한 동물을 사용하며 시험 전 최소 7 일 동안 실험실 환경에 순화시킨다.
- (2) 시험동물은 종, 계통, 근원, 성별, 체중 및 나이를 고려해야한다. 시험을 시작하는 시점에서 시험에 사용할 암수 동물의 체중은 시험에 사용하는 모든 동물의 평균 무게의 $\pm 20\%$ 를 넘지 않도록 한다. 대조군과 투여군의 시험동물은 무작위로 배정하도록 한다.
- (3) 각 동물에게 고유한 식별 번호를 부여하고 문신, 마이크로 칩 삽입 또는 기타 적절한 방법으로 식별 번호가 지워지지 않도록 한다.

2.2. 중간 부검군, 회복군 및 질병 모니터링군

2.2.1. 중간 부검군

만성독성단계시험에서는 6 개월 시점의 중간 부검군을 둘 수 있으며 12 개월의 만성독성 단계시험에 사용된 동물은 발암성 단계시험의 중간 부검군으로 볼 수 있다. 각 시험군에 포함된 동물의 수는 일반적으로 암수 10 마리이며, 체중, 사료/음용수 섭취량, 혈액학 지표 및 임상생화학 지표 측정, 병리학적 조사를 포함한 사항을 측정/관찰한다. 중간 부검군에 대해서는 신경 독성 또는 면역 독성과 같은 특정 주요 시험항목에만 국한하여 실시할 수 있다.

2.2.2. 회복군

시험대상 화학물질에 의해 유발된 독성 변화의 가역성을 모니터링하기 위해 만성 독성 단계시험에 회복군을 포함시킬 수 있다. 회복군은 투여군 중 최고용량군과 대조군으로 제한할 수 있다. 만성독성단계 시험의 본 시험에 할당된 동물과 마찬가지로 일반적으로 체중, 사료/음용수 섭취량, 혈액학 지표 및 임상생화학 지표 측정, 병리학적 조사를 포함한 사항을 측정/관찰한다.

2.2.3. 질병 모니터링군

필요한 경우 시험기간 동안 발생할 수 있는 질병 상태를 모니터링하기 위해 질병 모니터링군(일반적으로 암수 각 5 마리)을 추가로 포함할 수 있다.

3. 시험방법

3.1. 투여군 및 투여용법

만성독성 단계시험 및 발암성 단계시험 모두 최소 3 단계 용량의 투여군과 대조군을 둔다. 용량은 일반적으로 단기간반복투여시험 또는 용량설정시험 결과를 바탕으로 결정한다. 시험물질 또는 관련 물질에 대한 기존의 독성 및 독성동태 자료를 최대한 활용하며 다음의 사항을 고려한다.

- (1) 용량을 선정할 때에는 해당 용량에서 얻은 시험 자료가 OECD 국가 간의 규제 요건(예, 유해 및 위해성평가, 분류 및 표지, 내분비계 장애평가 등)에 적절한지를 고려하여야 한다.

- (2) 만약, 최소 1,000 mg/kg/day에 해당하는 하나의 용량에서 부작용을 일으키지 않을 것으로 예측된다면, 군이 만성독성 단계시험의 본 시험에서 3 가지 용량 군 모두를 설정하지 않아도 된다. 인체노출량이 매우 커서 1,000 mg/kg/day 용량 이상으로 시험해야 할 필요성이 제기되는 경우를 제외하고는, 1,000 mg/kg/day을 한계용량으로 사용하여 시험할 수 도 있다.
- (3) 동물에게 고통을 주거나 심각한 독성, 질병 또는 사망을 초래하지 않는 범위 내에서 최고용량을 선택하여야 하며 체중증가의 감소분이 10 % 정도 나타나는 용량을 최고용량(Highest dose)으로 한다. 시험의 목적에 따라서는 시험물질에 의한 악영향을 나타내지만 수명이나 체중에는 전혀 영향을 미치지 않는, 최고용량 보다는 한 단계 낮은 고용량(Top dose)을 선정할 수도 있다.
- (4) 용량 및 용량간격은 용량-반응이 나타나는 범위에 들도록 설정하며, 저농도는 무영향관찰용량(NOAEL, No Observed Adverse Effect Level) 또는 기준용량(BMD, Bench Mark Dose)을 설정할 수 있는 수준으로 설정한다.
- (5) 용량간격은 시험 물질의 특성에 따라 다르며 최고용량(고용량)을 기준으로 저용량을 설정할 때는 공비 값 2 ~ 4를 적용하는 것이 좋다.
- (6) 용량 선택 시 아래 사항을 고려한다.
- 용량-반응 곡선에서 알려진 또는 예상되는 비선형성 또는 변곡점
 - 독성동태자료, 그리고 외부용량과 내부용량 간에 대사활성의 유도, 포화 또는 비선형성이 발생하거나/발생하지 않는 용량범위
 - 병변으로 발전될 전조, 영향지표, 또는 핵심적인 생물학적 반응과정의 지표
 - 세포 독성이 발생하기 시작하는 용량, 호르몬 농도의 교란이 발생하는 용량, 항상성 메커니즘이 급격히 깨어지는 용량 등 작용기전의 주요 사항
 - BMD 예측 값 또는 역치의 범위 등 특히 그 값을 정확히 알아야 하는 범위에서의 용량-반응 곡선의 영역
 - 예상되는 인체 노출 수준
- (7) 대조군은 어떤 물질도 처리하지 않은 무처리군으로 두거나 시험물질 투여 시 용매를 사용할 경우에는 이 때 사용한 용매를 처리한다. 시험물질을 처리하는 것을 제외하고는, 대조군의 동물은 처리군의 동물과 동일한 방식으로 취급한

다. 용매를 사용하는 경우, 용량군 중 최고용량군에 사용한 용매의 양을 대조군에도 처리한다.

3.2. 용량조제 및 시험물질 투여

시험물질은 일반적으로 사료, 음용수 또는 위관투여법을 통해 경구로 투여한다. 투여 경로와 방법은 시험 목적, 시험 물질의 물리적/화학적 특성, 생체 이용률, 인간의 주요한 노출경로와 노출 방법에 따라 결정한다. 선택된 경로와 투여 방법에 대해서는 논리적 근거를 제시하며 다음의 사항을 고려하여 결정한다.

- (1) 필요한 경우, 시험 물질을 적절한 용매에 녹이거나 현탁시킨다. 용매를 선정할 때에는 수용액/현탁액을 우선 고려하며 그 다음으로 오일의 용액/유탁액을 고려하고, 그 다음으로는 다른 가능한 용매를 고려한다.
- (2) 사료나 음용수를 통해 투여되는 물질의 경우 시험 물질의 양이 정상적인 영양 균형 또는 물 균형을 저해하지 않는지 확인하는 것이 중요하다. 시험물질을 사료에 혼합하여 투여하는 경우, 총 사료의 5 %의 상한선을 초과하지 않아야 한다.
- (3) 경구투여의 경우, 일반적으로 시험물질을 12 개월 동안 매일 투여한다(주 당 7 일). 경피투여의 경우 1 일 6 시간, 주 7 일 일정으로 12 개월 동안 투여한다. 흡입경로의 경우 1 일 6 시간, 주 7 일 일정으로 12 개월 동안 투여한다. 경구 또는 흡입경로의 경우 논리적 근거가 있는 경우 주 5 일 투여가 가능하다. 노출 기간은 일반적으로 12 개월(만성독성 단계시험) 및 24 개월(발암성 단계시험)로 한다.
- (4) 시험물질이 국소자극제인 경우 하루 2 번으로 분할 투여가 가능하며 이때는 1 일 투여량을 유지해야 한다. 투여량이 일정한 부피가 되도록 농도를 조절하여 투여액량을 동일하게 하여야 한다. 심각한 자극을 피하기 위해 시험물질을 희석하여 사용할 필요가 있다. 분할 투여의 경우 한 번에 투여할 투여액량의 최대량은 동물의 크기에 달려 있지만 일반적으로 설치류의 경우 100 g 체중 당 1 mL를 초과하지 않아야 한다.

3.3. 시험기간

3.3.1. 만성독성 단계시험

- (1) 만성독성 단계시험의 투여기간이 주로 12 개월이며 규제기관의 규정이나 또는 작용기전 연구목적을 위해서는 더 짧은 기간(예: 6 개월 또는 9 개월) 또는 더 긴 기간(예: 18 개월 또는 24 개월)의 시험도 가능하다. 이 경우 그 논리적 근거를 제시하여야 한다.
- (2) 시험물질에 의해 유도된 독성변화의 가역성(회복되는 지의 여부)을 모니터링 하기 위해 포함된 회복군은 투여종료 후 4 주 이상의 기간 및 총 연구기간의 1/3 이하의 기간 동안 투여하지 않은 상태로 둔다.

3.3.2. 발암성 단계시험

- (1) 발암성 단계시험의 투여기간은 설치류의 경우 대개 24 개월이며, 이는 실험에 사용되는 동물의 전생애 기간의 대부분에 해당한다. 시험동물종의 수명에 따라 시험기간을 더 짧게 혹은 더 길게 할 수도 있으며 이 경우에는 논리적 근거를 제시한다.
- (2) 시험의 투여기간 설정에서 고려해야 할 사항은 다음과 같다.
 - 저용량군 또는 대조군의 생존율이 25 % 미만으로 떨어지면 시험 종료를 고려
 - 고농도군에서만 독성으로 인해 조기에 사망하는 경우에는 시험을 종료하지 않음
 - 생존율은 암수 별도로 산출
 - 시험결과가 통계적으로 유효한 평가를 하기에 더 이상 충분하지 않은 시점까지 연장하여 시험을 하지 않아야 함

4. 만성독성 단계시험의 관찰

독성반응이 최고로 나타날 것으로 예상되는 시점을 고려하여 하루에 적어도 한번, 동일 시간대에 일반 임상변화에 대한 관찰을 실시해야한다.

- (1) 첫 번째 노출 이전(동물 내 비교를 가능하기 위함), 시험 첫 주가 끝나는 날,

그리고 그 후에는 매달 모든 동물에 대해 최소한 다음 지표에 대한 임상관찰을 실시한다.

- 피부, 모피, 눈, 점막, 분비물 및 배설물의 발생 및 자율 신경계 활동(예: 눈물샘, 눈꺼풀 처짐, 동공 크기 및 비정상적인 호흡 패턴)
- 가능한 경우에는 걸음걸이, 자세 및 촉감에 대한 반응, 간헐적인 경련성 운동 또는 긴장성 운동, 상동증(예: 과도한 털손질, 반복적인 선회) 또는 기괴한 행동(예: 자해, 뒤로 걷기)

(2) 시험물질을 첫 번째 투여하기 전과 시험 종료 시에 검안경이나 기타 적절한 장비를 사용하여 모든 동물에 대해 눈 검사를 실시한다. 적어도 고용량 및 대조군에서는 반드시 수행하고, 이상이 관찰될 경우 모든 동물에 대해 실시한다.

(3) 이전에 수행한 28 일 반복투여독성시험 및 90 일 반복투여 독성시험 결과, 신경독성 영향을 유발할 가능성이 있는 화학 물질의 경우에는 다른 유형의 자극(예: 청각, 시각 및 고유 감각 자극)에 대한 감각 반응, 악력 평가 및 운동 활동을 선택적으로 평가할 수도 있다. 평가는 시험 시작 전, 시험 시작 후 3 개월 까지, 그리고 12개월 사이에, 또는 시험 종료 시(12 개월 이상인 경우)에 수행할 수 있다.

(4) 이전에 수행한 28 일 반복투여독성시험 및 90 일 반복투여 독성시험 결과, 면역 독성을 일으킬 가능성이 있는 화학 물질의 경우, 시험 종료 시 면역독성에 대한 추가 조사가 선택적으로 수행할 수 있다.

4.1. 체중, 사료/음용수 섭취 및 사료 효율성

모든 동물들은 투여 시작 시, 첫 13 주 동안 최소 일주일에 한 번씩, 그 이후에는 매월 마다 체중을 측정한다. 사료 섭취량 및 사료 효율성 측정은 첫 13 주 동안 최소 매주, 적어도 그 이후에는 매월 측정한다. 시험물질을 음용수를 통해 투여할 경우, 음용수 섭취량은 처음 13 주 동안 최소 매주, 이후에는 적어도 매월 측정한다.

4.2. 혈액학 및 임상 생화학적 검사

- (1) 설치류를 대상으로 시험하는 경우, 수컷 최소 10 마리와 암컷 최소 10 마리에 대해 3 개월, 6 개월, 12 개월 및 시험 종료 시(12 개월보다 긴 경우)에 혈액 검사를 실시한다. 마우스의 경우 별도의 채혈군이 필요할 수 있다.
- (2) 혈액학적 지표는 백혈구 수(전체 수 및 분율), 적혈구 수, 혈소판 수, 헤모글로빈 농도, 헤마토크릿(침전된 세포의 부피), 평균 혈구체적(MCV, Mean Corpuscular Volume), 평균 혈구 헤모글로빈(MCH, Mean Corpuscular Haemoglobin), 평균 혈구 헤모글로빈 농도(MCHC, Mean Corpuscular Haemoglobin Concentration), 프로트롬빈 시간 및 활성화트롬보플라스틴 시간(APTT, Activated Partial Thromboplastin Time) 등을 포함한다. 아울러 하인즈 소체(Heinz body)나 다른 비정상 적혈구 형태 또는 메트헤모글로빈과 같은 다른 혈액학 지표는 시험물질의 독성에 따라 적절히 추가하여 측정할 수도 있다.
- (3) 채취한 혈액 표본에 대해 임상 생화학적 지표를 측정한다. 혈액 채취 전에 시험동물을 절식시키는 것이 좋다(마우스의 경우 제외할 수 있다.). 혈당, 우레아(요소 질소), 크레아티닌, 총 단백질, 알부민, 칼슘, 나트륨, 칼륨, 총 콜레스테롤, 2 개 이상의 간세포 평가지표(알라닌 아미노기 전이효소, 아스파테이트 아미노기 전이효소, 글루탐산탈수소효소, 총 담즙산), 2 개 이상의 간담도 평가지표(알칼린 포스파타아제, 감마 글루타밀 전이효소, 5'-뉴클레오티다아제, 총 빌리루빈, 총 담즙산). 그 외의 지표는 시험물질의 독성에 따라 적절히 측정한다. 전반적으로 시험물질 투여에 의해 관찰 및/또는 예측되는 영향에 따라 유연한 접근 방법이 필요하다.
- (4) 소변 검사는 혈액학 및 임상생화학 지표 측정 시험과 동일한 간격으로 채집된 시료에 대해 군 당 최소 수컷 10 마리와 암컷 최소 10 마리에 대해 실시한다. 외형, 부피, 삼투압 또는 비중, pH, 총 단백질 및 포도당, 케톤, 우로빌리노젠, 빌리루빈 및 잠혈 등을 포함하여 관측된 독성영향에 대한 조사를 확장하기 위해, 필요하다면 보다 정밀한 다른 임상생화학 지표를 측정할 수도 있다.

4.3. 병리학적 검사

4.3.1. 일반부검

- (1) 시험에 사용된 모든 동물에 대해서는 신체의 외부 표면, 모든 구멍, 두개골, 흉부 및 복강과 그 내용물에 대해 완전하고 세밀한 검사를 실시한다.
- (2) 장기 무게는 모든 동물(죽거나 병이 발견된 것과는 별개)의 부신, 뇌, 부고환, 심장, 신장, 간, 난소, 비장, 고환, 갑상선(부갑상선과 함께 측정 후 고정), 자궁은 적절하게 부착 조직을 정돈하고 절개 후 건조 방지를 위해 가능한 한 빨리 습윤 무게를 측정한다. 마우스를 사용하는 시험에서 부신의 무게를 측정하는 것은 선택 사항이다.
- (3) 다음에 제시된 조직에 대해서는 조직 유형 확인이나 필요한 조직병리학적 검사를 위해 가장 적절한 고정 용매를 사용하여 고정시켜 둔다. 쌍을 이룬 장기의 경우 양쪽 쌍 모두를 보존한다. 심한 손상을 보이는 모든 병소, 심장, 췌장, 위(전위, 선위), 부신, 회장, 부갑상선, 대동맥, 공장, 말초신경, 고환, 뇌(대뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 신장, 뇌하수체, 흉선, 맹장, 눈물샘, 전립선, 갑상선, 간, 직장, 응고선, 폐, 침샘, 기도, 결장, 림프절(표부와 심부), 정낭, 방광, 십이지장, 유선(암컷에서는 필수, 수컷에서는 육안 해부 가능한 경우), 골격근, 자궁(자궁경부 포함), 부고환, 피부, 눈(망막 포함), 식도, 척수(3단계: 경부, 중흉부 및 요추), 비장, 질, 담낭(렛드 이외의 종), 난소, 골수 단면 및/또는 신선한 골수, 하더 샘 등을 포함한다. 치아, 혀, 상기도(코, 비갑개 및 부비강 포함), 요관, 요도, 관절 포함 대퇴골, 후각망울, 흉골 등은 선택 사항이다.

4.3.2. 조직병리학적 검사

조직병리학적 검사는 최소한 다음에 제시된 조직에 대해 수행한다.

- 고용량 및 대조군의 모든 조직
- 시험 중에 죽거나 치사시킨 동물의 모든 조직
- 육안적 이상을 보이는 모든 조직
- 표적장기의 조직, 고용량군에서 시험물질과 관련한 독성 변화를 보이는 조직
- 신장, 부신과 같은 쌍을 이룬 장기의 경우에는 각 쌍의 조직

5. 발암성 단계시험의 관찰

- (1) 모든 동물에서 주말과 공휴일을 포함하여 매일 시험업무의 시작과 종료 시에 질병이나 사망 여부를 확인한다. 종양발생에 대해서는 특별히 더욱 주의 깊은 관찰이 필요하다. 종양발생시점, 부위, 크기, 외양, 시각 및 축각으로 확인되는 각 종양의 진행사항에 대해 기록한다.
- (2) 모든 동물들에서 투여 시작 시, 첫 13 주 동안 최소 일주일에 한 번씩, 그 이후에는 매월 체중을 측정한다. 사료섭취량 및 사료 효율성 측정은 첫 13 주 동안 최소 매주, 적어도 그 이후에는 매월 측정한다. 시험물질을 음용수에 용해시켜 투여할 경우, 음용수 섭취량은 처음 13 주 동안 최소 매주, 이후에는 적어도 매월 측정한다. 실험동물이 음용수를 마시는 행동에 변화를 보일 때에는 음용수의 섭취량을 측정한다.

5.1. 혈액학, 임상 생화학 및 기타 측정

만성독성 단계에서 12 개월 동안 투여한 동물로부터 얻은 자료는 발암성 단계의 혈액지표 및 혈청생화학 지표에 중요한 정보를 제공하게 된다. 골수가 시험물질의 목표장기로 생각되는 경우에는, 혈액도말검사가 발암성/종양가능성 평가 시험에 유용한지에 대해서는 여전히 의문이 제기되고는 있지만, 혈액도말을 제작할 수도 있다.

5.2. 병리학적 검사

5.2.1. 일반부검

- (1) 질병모니터링군 및 위성군을 제외한, 시험에 사용된 모든 동물에 대해서는 신체의 외부 표면, 모든 구멍, 두개골, 흉부 및 복강과 그 내용물에 대해 완전하고 세밀한 검사를 실시한다.
- (2) 다음에 제시된 조직에 대해서는 조직 유형 확인이나 필요한 조직병리학적 검사를 위해 가장 적절한 고정 용매를 사용하여 고정시켜 둔다. 쌍을 이룬 장기의 경우 양쪽 쌍 모두를 보존한다. 심한 손상을 보이는 모든 병소, 심장, 췌장, 위(전위, 선위), 부신, 회장, 부갑상선, 대동맥, 공장, 말초신경, 고환, 뇌(대

뇌, 소뇌 및 수질/뇌교 부분 포함), 신장, 뇌하수체, 흉선, 맹장, 눈물샘, 전립선, 갑상선, 간, 직장, 응고선, 폐, 침샘, 기도, 결장, 림프절(표부와 심부), 정낭, 방광, 십이지장, 유선(암컷에서는 필수, 수컷에서는 육안 해부 가능한 경우), 골격근, 자궁(자궁경부 포함), 부고환, 피부, 눈(망막 포함), 식도, 척수(3 단계: 경부, 중흉부 및 요추), 비장, 질, 담낭(렛드 이외의 종), 난소, 골수 단면 및/또는 신선한 골수, 하더 샘 등을 포함한다. 치아, 혀, 상기도(코, 비갑개 및 부비강 포함), 요관, 요도, 관절 포함 대퇴골, 후각망울, 흉골 등은 선택사항이다.

5.2.2. 조직병리학적 검사

독성병리 시험의 모범사례에 대한 지침서가 구비되어야 하며 조직병리학검사는 최소한 다음에 제시된 조직에 대해 수행한다.

- (1) 고용량 및 대조군의 모든 조직
- (2) 시험 중에 죽거나 치사시킨 동물의 모든 조직
- (3) 종양을 포함한 육안적 이상을 보이는 모든 조직
- (4) 고농도 투여군에서 시험물질과 관련된 조직병리학적 변화가 관찰되는 경우, 다른 모든 투여군의 모든 동물의 동일 조직
- (5) 신장, 부신과 같은 쌍을 이룬 장기의 경우에는 각 쌍의 조직

III. 시험자료 및 보고(발암성 및 만성독성)

1. 시험자료

- (1) 평가를 수행한 모든 측정 지표에 대해 개별 동물별로 시험자료를 제시한다. 독성자료는 가능한 표로 요약하여 제시한다.
- (2) 실험실에서 수행된 과거의 대조군 자료(Historical control data)는 시험의 결과를 해석하는 데 매우 중요하다.
- (3) 수치 결과는 적절한 통계 방법에 따라 처리되어야 한다. 분석할 통계 방법과 자료는 시험을 설계할 당시에 미리 선정한다.

2. 시험결과의 보고

시험의 보고서에는 다음과 같은 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질

- (1) 물리적 성질, 순도 및 물리 화학적 성질
- (2) 식별 자료
- (3) 물질의 출처
- (4) 배치 번호
- (5) 화학 분석 증명서

2.2. 시험용매(해당되는 경우)

- (1) 시험용매 선택에 대한 타당성(물이 아닌 용매를 사용하였을 경우)

2.3. 시험동물

- (1) 사용된 종/균주 및 선택의 근거
- (2) 시험 시작 시 동물의 수, 연령 및 성별
- (3) 구입처, 사육 조건, 사료 등
- (4) 시험 시작 시 동물의 개체 무게

2.4. 시험조건

- (1) 투여 경로 및 용량 선택에 대한 이론적 근거
- (2) 자료 분석에 사용한 통계 방법(적용될 경우)
- (3) 시험물질 배합/사료 조제에 대한 세부 사항
- (4) 시험물질 제제의 농도, 안정성 및 목표설정 농도에 대한 분석 자료
- (5) 투여 경로 및 시험물질 투여에 관한 세부사항
- (6) 흡입시험, 비부노출 또는 전신노출 여부
- (7) 실제 용량(mg/kg/day) 및 사료/음용수의 시험물질 농도로부터 실제용량을 계산하기 위한 전환계수

(8) 사료 및 음용수에 대한 세부 정보

2.5. 결과 (요약된 표 자료 및 개별 동물 자료를 제시함)

2.5.1. 일반사항

- (1) 생존 자료
- (2) 체중 및 체중의 변화
- (3) 사료섭취량, 사료 효율 계산 값(수행하였다면), 음용수 섭취량(해당되는 경우)
- (4) 독성동태 자료(확보 가능한 경우)
- (5) 눈 검사(확보 가능한 경우)
- (6) 임상생화학적 검사(확보 가능한 경우)

2.5.2. 임상관찰결과

- (1) 독성증상
- (2) 이상 소견의 발생률(측정한 경우, 증증도)
- (3) 이상 임상증상의 특징, 정도, 관찰된 기간(일시적인지 지속적인지) 부검자료
- (4) 부검 시 체중
- (5) 장기중량(체중대비 장기 중량비)
- (6) 부검 결과: 이상소견의 발생률 및 정도

2.5.3. 조직병리학적 검사

- (1) 비 종양성 조직병리학적 관찰 결과
- (2) 종양성 조직병리학적 관찰 결과
- (3) 일반관찰과 현미경관찰의 상관성
- (4) 증증도를 포함하여 시험물질 투여와 관련한 모든 조직병리학적 발견에 관한 세부사항
- (5) 슬라이드 전문가 리뷰결과 보고서

2.6. 결과에 대한 적절한 통계 처리

2.7. 토론사항

- (1) 용량:반응 관계
- (2) 작용기전에 대한 정보
- (3) 모델링 방법(있는 경우)에 대한 토론 내용
- (4) 기준용량(BMD), 무영향관찰용량(NOAEI) 또는 최소영향관찰용량(LOAEI, Lowest Observed Adverse Effect Level)의 결정
- (5) 시험수행기관의 과거에 수행된 대조군의 시험자료
- (6) 인체와의 상관성

2.8. 결론

제54항 에스트로겐 수용체 전사활성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 에스트로겐 수용체($ER\alpha$ 그리고/또는 $ER\beta$)의 전사활성을 측정함으로써 에스트로겐 작용물질과 길항물질을 동정하는데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. SSTA 분석법

에스트로겐 수용체 α ($ER\alpha$)를 안정적으로 전사하도록 형질전환시킨 $ER\alpha$ -HeLa-9902 세포주를 이용하여 에스트로겐 작용물질 또는 길항물질을 동정하는 분석방법

2.2. VN7Luc $ER\alpha$ 분석법

인간 에스트로겐 수용체 α ($hER\alpha$)를 우세하게 발현하고 $ER\beta$ 를 적게 발현하는 VM7Luc4E2 세포주를 이용하여 에스트로겐 작용물질 또는 길항물질을 동정하는 분석방법

2.3. $ER\alpha$ CALUX 분석법

에스트로겐 수용체 α ($ER\alpha$)를 안정적으로 전사하도록 형질전환시킨 U2OS $ER\alpha$ -CALUX 세포주를 이용하여 에스트로겐 작용물질 또는 길항물질을 동정하는 분석방법

2.4. 작용물질

에스트로겐 수용체(ER)에 결합하여 에스트로겐과 유사한 생물학적 반응을 일으키는 물질

2.5. 길항물질

에스트로겐 수용체(ER)에 결합하여 스스로 생물학적 반응을 유발하지는 않으나, 작용물질의 반응을 차단 또는 감소시키는 물질

II. 시험

1. 원리

ER과 시험물질의 직접적 또는 간접적 상호작용을 기반으로 ER에 의해 조절되는 리포터 유전자의 전사활성을 측정함으로써, ER을 활성화시키거나 또는 억제하는 화학물질을 동정한다. STTA 분석법, VM7Luc ER TA 분석법, ER α CALUX 분석법 등이 있다. 루시페라제 리포터 유전자의 발현은 기질인 루시페린을 첨가하면 생물학적 발광 물질로 변환하여 발광광도계에서 정량적으로 측정할 수 있다.

2. 시험의 준비

2.1. 실험실 숙련도 검증

- (1) ER 작용물질 (14 종, 부록 1)과 길항물질 (10 종, 부록 2)에 대한 숙련도 시험을 실시한다.
- (2) 숙련도 시험은 최소한 적어도 2 번 이상 실시하되, 서로 다른 날에 실시한다.

2.2. 세포주

- (1) 시험 방법에 따라 규정된 세포주를 사용한다. STTA 분석법은 hER α -HeLa-9903 세포주, VM7Luc ER TA 분석법은 VM7Luc4E2 세포주, ER α CALUX 분석법은 U2OS ER α CALUX 세포주를 사용한다.
- (2) 마이코플라즈마에 오염되지 않은 세포만을 사용한다.

2.3. 세포의 안정성

- (1) 세포의 안정성과 온전성을 유지하기 위해, 동결 보존 세포를 꺼내 1 계대 이상 배양하여 사용하되, 30 계대 이상으로 배양하지 않는다.
- (2) 시험에 사용하는 세포주의 ER-매개 반응이 시간의 경과에도 불구하고 온전하게 유지되는지를 평가하기 위해 기준물질을 사용하여 세포의 완전성을 모니터링한다.

3. 시험방법

3.1. 세포의 배양

- (1) 시험 방법에 따라 규정된 세포주에 적합한 배지로 배양하며, 세포 배양밀집도가 75 % ~ 90 %에 도달하면 계대 배양한다.

- (2) 에스트로겐이 함유되지 않은 배지를 사용하고, 분석에 사용되는 플라스틱 용기는 에스트로겐 활성을 보이지 않는 제품을 사용한다.

3.2. 용매

시험물질은 적절한 용매에 잘 녹으며 세포 배양 배지에 쉽게 혼합되어야 한다. 디메틸설폭사이드(DMSO), 물, 에탄올 (95 % 부터 100 % 순도)이 용매로 적절하다. DMSO의 경우, 배지 중에서의 최종농도가 1 % (v/v)를 넘지 않아야 한다. 용매는 최대 사용량에서 세포독성을 나타내지 않으며 시험 수행과정에 간섭하지 않아야 한다.

3.2. 기준물질과 대조군

3.2.1. 작용물질 시험법에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 기준물질로는 17β -에스트라디올(E2)를 사용한다.
- (2) 양성대조물질로는 VM7Luc ER TA 분석법에서는 p,p'-메톡시클로르, STTA 분석법과 ER α CALUX 분석법에서는 17α -메틸테스토스테론을 사용한다.
- (3) 음성대조물질로는 STTA 분석법과 ER α CALUX 분석법에서는 코르티코스테론을 사용한다.
- (3) 기준물질의 최대 RLU(relative light unit) 평균값을 용매 대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때 4 이상이어야 한다.

3.2.2. 길항물질 시험법에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 길항물질 시험법에서는 E2와 함께 기준물질 및 대조물질을 추가하여 시험한다.
- (2) 기준물질로는 VM7Luc ER TA 분석법에서는 라록시펜, STTA 분석법과 ER α CALUX 분석법에서는 타목시펜을 사용한다.
- (3) 양성대조물질로는 VM7Luc ER TA 분석법과 STTA 분석법에서는 타목시펜, ER α CALUX 분석법에서는 4-하이드록시타목시펜을 사용한다.
- (4) 음성대조물질로는 STTA 분석법에서는 플루타마이드, ER α CALUX 분석법에서는 레스베라트롤을 사용한다.
- (5) 기준물질의 최대 RLU 평균값을 용매 대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때 나누어 3 이상이어야 한다.

3.3. 시험물질의 준비

시험물질은 100 % DMSO(또는 적절한 용매)에 녹이고, 배양 배지로 적절한 농도로 희석한다. 모든 시험물질은 용해되거나 희석되기 전에 실온에서 평형을 이루도록 한다. 시험물질을 녹였을 때 용액에는 눈에 띄는 침전이나 혼탁함이 있어서는 안 된다. 시험물질 용액은 반드시 매 실험마다 새롭게 준비하고 24 시간 이내에 사용하도록 한다.

3.4. 농도범위 설정을 위한 용해도와 세포 독성

- (1) 시험물질의 시작 농도와 희석 정도를 결정하기 위하여 농도범위 설정 시험을 수행한다.
- (2) 시험물질은 1 μ L/mL, 1 mg/mL, 1 mM 중 가장 낮은 농도에 해당하는 농도를 최대 농도로 하여 1 : 10 배율로 단계 희석하여 시험하고, 혼탁과 침전 또는 세포 독성 유무를 2 회(필요하다면 3 회) 반복하여 확인한다.
- (3) 세포 생존율이 20 % 이상 감소된 시험물질 농도는 세포독성이 있다고 간주하고 그 이상의 농도는 사용하지 않는다.

3.5. 시험물질의 노출

- (1) 96-well 플레이트에서 배양한 세포 3 개 well 씩을 사용하여 연속적으로 단계 희석한 시험물질을 처리한다.
- (2) 작용물질 시험법에서는 96-well 플레이트에 용매대조군, 기준물질(E2), 양성대조군, 음성대조군을 포함하도록 한다. 길항물질 시험법에서는 96-well 플레이트에 용매대조군, E2 대조군, E2를 포함한 기준물질(타목시펜 또는 라록시펜, 플루타미드), 양성대조군과 음성대조군을 포함하도록 한다.
- (2) 시험물질을 처리한 후 CO₂ 배양기에서 19 시간 ~ 24 시간 배양한다.
- (3) 휘발성이 높은 시험물질은 인접한 well에 유입될 수 있으므로 특별히 관리할 필요가 있다. 이러한 경우 플레이트를 밀전함으로써 시험 중인 각 well간을 효과적으로 차단할 수 있다.

3.6. 루시퍼라제 분석

세포를 용해시킨 후, 기질인 루시페린을 첨가하여 방출하는 발광량을 측정함으로써 well 당 RLU를 표현한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1. ER 작용물질

- (1) 용매 대조군의 평균값을 계산한다.
- (2) 각 well의 값에서 용매 대조군의 평균값을 뺀 값으로 전사활성을 계산한다.
- (3) 기준물질 최대농도에 대한 유도 배율의 평균값을 계산하고, 이를 PC₁₀₀으로 한다.
- (4) 시험물질에 대한 상대적 전사활성의 평균값을 계산한다.
- (5) Hill 식 또는 이와 대체 가능한 적절한 방법을 사용하고, PC₅₀, PC₁₀, EC₅₀, EC₁₀을 계산하기 위하여 적절한 통계적 소프트웨어를 사용한다.

$$Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + 10^{\exp((\log \text{EC}_{50} - X) \times \text{Hill slope}))}$$

(X는 농도의 로그값, Y는 반응을 나타낸다.)

- (6) 시험물질은 세포독성이나 용해도 문제 때문에 완전한 용량-반응 곡선을 그리지 않을 수도 있으며, 이 경우에는 PC₁₀과 시험물질의 상대적 최대 활성 유도 (TC_{max}) 만을 결정한다.

1.2. ER 길항물질

- (1) 용매 대조군의 평균값을 계산한다.
- (2) 각 well의 값에서 용매 대조군의 평균값을 뺀 값으로 전사활성을 계산한다.
- (3) 기준물질 최대농도에 대한 유도 배율의 평균값을 계산하고, 이를 PC₁₀₀으로 한다.
- (4) 시험물질에 대한 상대적 전사활성의 평균값을 계산한다.
- (5) 기준물질과 시험물질의 IC₅₀, IC₃₀ 또는 IC₁₀을 계산한다.

2. 시험의 성립기준

2.1. 허용 기준

- (1) 시험자료는 반드시 ER 활성 또는 억제에 대한 정량적 평가를 하는데 충분해야 한다.
- (2) 기준 에스트로겐의 기준 농도에 대한 평균 리포터 활성도는 시험 방법에서 규정된 최소값을 나타내야 한다.
- (3) 시험 농도는 반드시 시험물질의 용해 범위 내에 있어야 하고, 세포독성이 나타나지 않아야 한다.

2.2. 시험 자료의 판정

- (1) 각 시험 방법에서 조정된 시험자료의 해석은 양성과 음성 반응을 분류하는데 사용한다.
- (2) 허용 기준에 적합하고, 두 번의 시험시행에서 재현성이 확인되었다면 세 번째 시험을 수행할 필요는 없다.
- (3) 두 번의 시험 시행에서 재현성이 없다면 적어도 세 번의 독립적인 시험을 수행하고 세 번 중 두 번에서 일치된 결과에 근거하여 분류한다.
- (4) TC_{max} 가 기준물질 최대 반응의 10 %(PC_{10})와 같거나 초과하면 양성으로 판정하고, PC_{10} 을 초과하지 않으면 음성으로 판정한다.
- (5) 시험물질의 상대적 전사활성이 기준물질 최대 반응의 20 %(IC_{20}) 이상을 억제하거나 또는 시험물질의 IC_{30} 이 계산되는 경우 양성으로 판정하고, 그렇지 못한 경우는 음성으로 판정한다.

3. 시험결과의 보고

3.1. 시험방법

- (1) 사용된 시험 방법

3.2. 대조군, 기준물질, 시험물질의 정보

3.2.1. 출처, 로트 수, 유효기간

- (1) 단일 구성 물질의 물질데이터(CAS명, CAS 번호) 및 물리화학적 성질
- (2) 다중 구성 물질 및 혼합물의 물질데이터 및 물리화학적 성질

3.2.2. 시험물질의 안정성

3.2.3. 용매/용제

- (1) 물질데이터, 로트 번호, 공급처
- (2) 용매/용제의 선택 기준
- (3) 알려졌다면 용해도와 안정성

3.2.4. 시험물질이 첨가된 배양 배지의 pH, 삼투압과 침전물 측정

3.3. 세포

- (1) 세포의 형태와 출처
- (2) 세포 계대 수
- (3) 세포 배양의 유지 방법

3.4. 시험 조건

- (1) 용해도의 한계
- (2) 적용된 검증 평가 방법
- (3) CO₂ 농도와 배지 구성성분
- (4) 시험물질의 농도
- (5) 첨가한 시험물질과 용매의 용량
- (6) 배양 온도와 습도
- (7) 처리 기간
- (8) 시작 지점과 처리 동안의 세포 밀도
- (9) 양성/음성 기준물질
- (10) 리포터 시약: 제품명, 공급자, 로트 번호
- (11) 시험 시행에서 양성, 음성 또는 모호함에 대한 판정 기준

3.5. 허용 기준

- (1) 각 분석 플레이트에 대한 유도 배율과 과거 대조군에 근거한 시험방법에서 요구하는 최소값에 대한 부합 여부
- (2) 동시 시행한 양성 대조군, 기준물질에 대한 허용 기준의 실제값(log₁₀EC₅₀, log₁₀PC₅, logIC₅₀) 그리고 기울기 값

3.6. 시험결과

- (1) 원래 시험자료와 조정된 시험자료
- (2) 최대 유도 배율
- (3) 세포독성 시험자료
- (4) 최소 유효 농도(해당시)
- (5) TC_{Max}, PC_{Max}, PC₅₀, IC₅₀ 또는 EC₅₀
- (6) 농도-반응 관계(해당시)

(7) 오류와 신뢰도를 측정한 통계적 분석 및 방법 설명

3.7. 시험결과에 대한 고찰 및 결론

부록 1. 작용물질 시험법을 위한 숙련도 물질(14 종)의 목록

NO	화학물질	CASRN	기대 반응	STTA 분석법			VM7Luc ER TA 분석법		MeSH화학물질 그룹	생산물 그룹
				PC ₁₀ 값(M)	PC ₅₀ 값(M)	시험농도범위(M)	VM7Luc EC ₅₀ 값(M)	농도설정의 최고농도(M)		
14	Diethylstilbestrol	56-53-1	POS	$< 1.00 \times 10^{-11}$	2.04×10^{-11}	$10^{-14} \sim 10^{-8}$	3.34×10^{-11}	3.73×10^{-4}	Hydrocarbon (Cyclic)	의약품, 동물용 의약품
12	17 α -estradiol	57-91-0	POS	4.27×10^{-11}	6.44×10^{-10}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	1.40×10^{-9}	3.67×10^{-3}	Steroid	의약품, 동물용 의약품
15	meso-Hexestrol	84-16-2	POS	$< 1.00 \times 10^{-11}$	2.75×10^{-11}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	1.65×10^{-11}	3.70×10^{-3}	Hydrocarbon (Cyclic), Phenol	의약품, 동물용 의약품
11	4-tert-Octylphenol	140-66-9	POS	1.85×10^{-9}	7.37×10^{-8}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	3.19×10^{-8}	4.85×10^{-3}	Phenol	화학중간물
9	Genistein	446-72-0	POS	2.24×10^{-9}	2.45×10^{-8}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	2.71×10^{-7}	3.70×10^{-4}	Flavonoid, Heterocyclic Compound	천연물, 의약품
6	Bisphenol A	80-05-7	POS	2.02×10^{-8}	2.94×10^{-7}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	5.33×10^{-7}	4.38×10^{-3}	Phenol	화학중간물
2	Kaempferol	520-18-3	POS	1.36×10^{-7}	1.21×10^{-6}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	3.99×10^{-6}	3.49×10^{-3}	Flavonoid, Heterocyclic Compound	천연물
3	Butylbenzyl phalate	85-68-7	POS	1.14×10^{-6}	4.11×10^{-6}	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	1.98×10^{-6}	3.20×10^{-4}	Carboxylic Acid, Ester, Phthalic Acid	가소제, 산업 화학물
4	p,p'-Methoxychlor	72-43-5	POS	1.23×10^{-6}	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	1.92×10^{-6}	2.89×10^{-3}	Hydrocarbon (Halogenated)	농약, 동물용 의약품
1	Ethyl paraben	120-47-8	POS	5.00×10^{-6}	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	2.48×10^{-5}	6.02×10^{-3}	Carboxylic Acid, Phenol	의약품, 보존제
17	Atrazine	1912-24-9	NEG	-	-	$10^{-10} \sim 10^{-4}$	-	4.64×10^{-4}	Heterocyclic Compound	제초제
20	Spirolactone	52-01-7	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	-	2.40×10^{-3}	Lactone, Steroid	의약품
21	Ketoconazole	65277-42-1	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	-	9.41×10^{-5}	Heterocyclic Compound	의약품
22	Reserpine	50-55-5	NEG	-	-	$10^{-11} \sim 10^{-5}$	-	1.64×10^{-3}	Heterocyclic Compound, Indole	의약품, 동물용 의약품

※ CASRN: Chemical Abstracts Service Registry Number, POS: positive, NEG: negative

부록 2. 길항물질 시험법에 관한 숙련도 물질(10 종)의 목록

	화학물질	CASRN	ER STTA 분석법1			VM7Luc ER TA 분석법2			ER STTA 예상효과	ICCVAM 분류	MeSH 화학물질 그룹	생산물 그룹
			ER TA 활성	IC ₅₀ (M)	시험농도 범위(M)	ER TA 활성	IC ₅₀ (M)	농도설정의 최고농도 (M)				
1	4-hydroxytamoxifen	68047-06-3	POS	3.97×10^{-9}	$10^{-12} \sim 10^{-7}$	POS	2.08×10^{-7}	2.58×10^{-4}	중간POS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	의약품
2	Raloxifene HCl	82640-04-8	POS	7.86×10^{-10}	$10^{-12} \sim 10^{-7}$	POS	1.19×10^{-9}	1.96×10^{-4}	중간OS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	의약품
3	Tamoxifen	10540-29-1	POS	4.91×10^{-7}	$10^{-10} \sim 10^{-5}$	POS	8.17×10^{-7}	2.69×10^{-4}	POS	POS	Hydrocarbon (Cyclic)	의약품
4	17 β -estradiol	50-28-2	NEG	-	$10^{-9} \sim 10^{-4}$	NEG	-	3.67×10^{-3}	음성일수 있음	PN	Steroid	의약품, 동물용 의약품
5	Apigenin	520-36-5	NEG	-	$10^{-9} \sim 10^{-4}$	NEG	-	3.70×10^{-4}	NEG	NEG	Heterocyclic Compound	염료, 천연물, 의약품 중간체
6	Di-n-butyl phthalate	84-74-2	NEG	-	$10^{-8} \sim 10^{-3}$	NEG	-	3.59×10^{-3}	NEG	NEG	Ester, Phthalic Acid	화장품 첨가제, 산업 화학물, 가스제
7	Flavone	525-82-6	NEG	-	$10^{-8} \sim 10^{-3}$	NEG	-	4.50×10^{-4}	음성일수 있음	PN	Flavonoid, Heterocyclic Compound	천연물, 의약품
8	Genistein	446-72-0	NEG	-	$10^{-9} \sim 10^{-4}$	NEG	-	3.70×10^{-4}	음성일수 있음	NEG	Flavonoid, Heterocyclic Compound	천연물, 의약품
9	p-n-nonylphenol	104-40-5	NEG	-	$10^{-9} \sim 10^{-4}$	NEG	-	4.54×10^{-4}	미시험	NEG	Phenol	화학물중간체
10	Resveratrol	501-36-0	NEG	-	$10^{-8} \sim 10^{-3}$	NEG	-	4.38×10^{-4}	음성일수 있음	NEG	Hydrocarbon (Cyclic)	천연물

※ M: molar, IC₅₀: half maximal inhibitory concentration of test substance, PN: presumed negative

제55항 H295R 스테로이드 합성 분석법

I. 개요

1. 목적

이 시험법은 스테로이드 합성과정 중 테스토스테론(T)과 17β -에스트라디올(E2)의 생산을 유도하거나 억제하는 화학물질을 동정하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 스테로이드 합성

콜레스테롤로부터 다양한 스테로이드 호르몬을 합성

2.2. 최소영향관찰농도(LOEC, Lowest-observed-effect-concentration)

시험물질을 시험동물에 투여하였을 때 시험동물에 영향을 나타내는 최소 농도

2.3 무영향관찰농도(NOEC, No-observed-effect-concentration)

시험물질노출과 관련된 영향이 관찰되지 않는 최고 농도

II. 시험

1. 원리

시험물질을 H295R 세포에 48 시간 동안 노출시킨 후 세포생존율을 측정한다. 이때 배양배지는 따로 취한 후 배양배지 중에 존재하는 호르몬의 농도를 측정한다. 용매 대조군과 비교하여 시험물질 처리군에서의 스테로이드 호르몬의 합성 배율을 계산하거나, 최소영향관찰농도(LOEC) 또는 무영향관찰농도(NOEC)로서 스테로이드 호르몬의 합성능을 나타낸다.

2. 시험의 준비

2.1. 세포주

(1) NCI-H295R 세포를 사용한다.

(2) 세포주는 입수하는 즉시 5 회 계대 배양하고 동결보관한다. 분석법에 적합한 계대 수는 동결보관한 배치에서 꺼내 배양하여 최대 10 계대 수를 초과해서는 안 된다.

- (3) 세포는 적절한 배양액을 사용하여 배양용기 바닥의 80 % ~ 90 %의 배양밀집도를 보이면 시험에 사용한다. 24-well 플레이트에 배지 1 mL 당 200,000 내지 300,000 개의 세포를 24 시간 배양하였을 때, 대략 50 % ~ 60 %의 배양밀집도를 나타내면 시험에 사용한다.

2.2. 시험물질

시험물질은 디메틸설폭사이드(DMSO)에 용해시키고, 적절히 7 단계로 희석한다. 배지 중 DMSO의 최종 농도는 0.1 % 이하가 되도록 하며, DMSO외에 다른 용매를 사용하는 경우에는 과학적인 타당한 이유를 제시한다.

2.3. 호르몬 측정

- (1) H295R 세포에 의한 T와 E2의 합성 분석에는 정량적 한계 (LOQ)를 포함한 수행 기준에 부합하는 측정 시스템을 사용할 수 있다. 정량적 한계는 T가 100 pg/mL, E2가 10 pg/mL이다. QC 기준은 부록 1에 명시하였다.
- (2) 용매대조군의 호르몬 농도는 표준 곡선에서 직선 범위에 있어야 한다.
- (3) 항체-기반 분석법으로 호르몬을 측정한다면 간섭 가능성을 시험해야 한다.

3. 시험방법

3.1. 숙련도 검증

- (1) 음성대조물질뿐만 아니라, 강, 중, 약의 유도제와 억제제를 7 단계 농도로 세포에 노출시켜서 시험한다.
- (2) 강력한 유도제인 포스콜린(CAS no. 66575-29-9); 강력한 억제제인 프로클로라즈(CAS no. 67747-09-5); 중간 유도제인 아트라진(CAS no. 1912-24-9); 중간 억제제인 아미노글루테티미드(CAS no. 125-84-8); 약한 유도제(E2 생산) 그리고 약한 억제제(T 생산)인 비스페놀 A(CAS no. 80-05-7); 그리고 음성 화학물질인 사람 융모성 생식샘자극호르몬(HCG)(CAS no. 9002-61-3)을 포함한다.
- (3) 세포 생존율과 호르몬을 분석한 최소영향관찰농도(LOEC) 값이 기준(부록 1)을 충족시킨다면 그 시험은 적절한 것으로 판단된다.

3.2. 시험물질의 노출

- (1) 용해도의 한계나 세포독성과 같은 우선적 정보가 시험 농도를 선택하는 기준이 되지 않는다면, 첫 번째 시험의 시험 농도는 최대 농도를 10^{-3} M으로 설정하고

\log_{10} 간격으로 희석하도록 권장한다. 이후의 실험에서는 처음 실시한 시험 농도의 결과에 근거하여 조절해야 한다.

- (2) 세포를 24-well 플레이트에서 24 시간 동안 배양한다. 그 후 배지를 제거하고, 시험물질이 함유된 배지 1 mL를 첨가한다. 48 시간 후에 배지를 제거하여 2 개로 나누고 세포는 세포 생존율/세포독성 분석을 실시한다. 배지는 호르몬 농도 분석을 할 때까지 -80°C 로 동결보관한다. 일반적으로 배지 안의 T와 E2는 -80°C 로 유지되는 동안 적어도 3 달 동안 안정하다.

3.3. 세포 생존율

- (1) 세포 생존율은 Live/Dead® Assay, MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] 시험 또는 육안 검사를 사용하여 측정한다. 세포 생존율은 용매대조군에서의 평균반응(= 100 % 생존율)과 관계를 표현한다.
- (2) 용매대조군의 생존율 평균에 대해 80 %보다 적은 생존율을 가진 well은 스테로이드 합성 최종 시험자료 분석에 포함되지 않도록 한다.
- (3) 세포생존율이 약 20 % 정도 감소할 경우에는 스테로이드 생성이 억제될 경우에도 그 결과는 신중히 평가하여야 한다. 세포독성이 억제의 원인이 아니라는 것을 보증해야 한다.

3.4. 호르몬 분석

- (1) T와 E2에 대한 호르몬 측정 시스템을 선택하여 사용할 수 있다. 통상적인 시험 키트를 사용하는 경우는 매뉴얼에 따라 수행해야 한다.
- (2) 여분의 배지를 부분 표본으로 표준 곡선의 직선 범위에 놓일 수 있는 농도로 희석하여 사용한다.
- (3) 최종 호르몬 농도는 다음과 같이 계산된다.

$$\text{최종 호르몬 농도} = \text{호르몬 농도}(\text{mL}) \div \text{희수율}(\text{희석값})$$

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리 및 평가

- (1) 시험 물질의 결과는 각 시험 플레이트의 용매대조군의 평균값을 뺀 값으로 사용한다. 모든 시험자료는 평균 \pm 표준편차로 나타낸다.
- (2) 세포 독성이 20 % 미만인 well의 호르몬 시험자료만을 분석에 포함한다. 상대 변화는 다음과 같이 계산해야 한다.

상대 변화 = (각 well에서의 호르몬 농도) ÷ (모든 용매 대조 well에서의
평균 호르몬 농도)

- (3) 육안 검사 또는 생존율/세포독성 분석에서 세포 수의 증가가 나타난 경우에는 시험 보고서에 기술해야 한다.
- (4) 시험 자료는 적절한 통계 방법에 따라 정규성과 분산 균질성에 대해 평가해야 한다. 차이는 $p \leq 0.05$ 에서 유의한 것으로 간주한다.
- (5) 결과는 그래프(평균 \pm 표준편차를 나타내는 막대 그래프) 및 표 형식 (LOEC/NOEC, 최대 반응 강도)으로 제시한다.

2. 판정

- (1) 시험자료는 QC 플레이트의 기준에 부합해야 한다. QC 기준(부록 2)에 부합하지 않는다면 이를 명시하고, 재분석하거나 시험자료 세트에서 제외한다.
- (2) 적어도 두 번의 독립적인 시험을 실시하고, 두 인접 농도의 용매 대조군과 유도 배율이 통계적으로 다른 경우에는($p \leq 0.05$) 화학 물질을 양성으로 판정한다. 부록 3에서 제시된 결정 기준을 충족시키지 못한다면 실험 결과를 해석할 수 없다.

3. 시험결과의 보고

3.1. 시험기관

- (1) 기관의 명칭 및 소재지
- (2) 시험책임자 및 담당자 성명

3.2. 시험물질 및 대조군

- (1) 물질데이터(CAS 명, CAS 번호) 및 공급처
- (2) 대조군의 물질데이터
- (3) 보관 조건, 안정성

3.3. 세포

- (1) 세포 유래와 형태
- (2) 시험에 사용된 세포 계대 수
- (3) 세포 배양 유지 과정

3.4. 예비 시험(해당시)

- (1) 화학물질의 호르몬-분석 간접 시험 설명과 결과
- (2) 호르몬 추출 효과 측정의 설명과 결과
- (3) 분석 방법에 대한 표준과 검정 곡선
- (4) 선택된 분석적 분석법의 검출 한계

3.5. 시험조건

- (1) 배지 구성
- (2) 시험 물질의 농도
- (3) 세포 밀도
- (4) 시험 물질의 용해도
- (5) 배양 시간과 환경

3.6. 시험결과

- (1) 대조군과 시험물질에 대한 각 well에 대한 원본 시험 자료
- (2) 시험자료 변환의 설명 또는 정규성의 검증
- (3) 측정된 각 well에 대한 평균 반응 \pm 표준편차
- (4) 세포독성 시험 자료
- (5) QC 요구사항의 충족 여부
- (6) 각 농도, 표준편차와 통계학적 유의성을 상대적으로 나타내는 막대 그래프

3.7. 시험결과에 대한 고찰

- (1) 시험자료 해석 과정의 적용
- (2) T/E2의 시험자료가 당류코르티코이드와 광물코르티코이드 경로에 간접적인 영향이 미칠 수 있다는 가능성에 대한 고찰

3.8. 결론

부록 1. 효능 물질에 대한 임계값(LOECs) 과 분류 결정

물질명	CAS no.	LOEC [μ M]		분류 결정	
		T	E2	T	E2
프로클로라즈	67747-09-5	≤ 0.1	≤ 1.0	+ (억제)	+ (억제)
포스콜린	66575-29-9	≤ 10	≤ 0.1	+ (유도)	+ (유도)
아트라진	1912-24-9	≤ 100	≤ 10	+ (유도)	+ (유도)
아미노글루테티미드	125-84-8	≤ 100	≤ 100	+ (억제)	+ (억제)
비스페놀 A	80-05-7	≤ 10	≤ 10	+ (억제)	+ (유도)
HCG	9002-61-3	n/a	n/a	음성	음성

※ +: positive, n/a: not applicable

부록 2. H295R 분석 시험 플레이트 평가지표에 대한 허용 가능 범위

	비교	T	E2
용매대조군에서의 기준 호르몬 생성	한계치 대비 유도 배율	≥ 5 배	≥ 2.5 배
노출 실험 - 플레이트 내의 표준편차(반복 wells)	절대 농도	≤ 30 %	≤ 30 %
노출 실험 - 플레이트 간 표준편차(반복 실험)	유도 배율 변화	≤ 30 %	≤ 30 %
호르몬 측정계 - 민감도	용매 대조군에 대한 측정가능한 상대적 유도-감소 배율	≥ 5 배	≥ 2.5 배
호르몬 측정계 - 반복적 표준편차 측정	절대 농도	≤ 25 %	≤ 25 %
배지추출 - (가능하다면) 내부 ^3H 표준물의 회수율	분당 분해수(DPM)	≥ 65 %	

부록 3. 독립적인 실험 결과 해석 결정 기준

시험시행1	시험시행 2		시험시행 3		결정	
예상	결정	예상	결정	예상	양성	음성
음성	확인	음성	시행 안함			X
음성	확인	양성	개선	음성		X
모호함	개선	음성	확인	음성		X
모호함	개선	음성	확인	양성	X	
모호함	개선	양성			X	
양성	개선	음성	확인	양성	X	
음성	확인	양성	개선	양성	X	
양성	개선	양성	시행 안함		X	

제56항 눈 부식성 및 자극성 플루오레세인 누출 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 세포독성과 세포기능을 기초로 하는 생체외 시험이며, 눈 부식성 물질 및 심각한 눈 자극 물질을 확인하는 데 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 눈 부식물질

- (a) 눈에 비가역적인 조직 손상을 일으키는 화학 물질
- (b) UN GHS 카테고리 1 또는 EU CLP 카테고리 1 또는 U.S. EPA 카테고리 I 눈 자극성 물질로 분류된 화학물질

2.2 눈 자극물질

- (a) 눈 전면에 적용했을 때 눈에 가역 변화를 일으키는 화학 물질
- (b) UN GHS 카테고리 2A, 2B 또는 EU CLP 카테고리 또는 U.S. EPA 카테고리 II, III의 눈 자극성 물질로 분류된 화학물질

2.3 심한 눈 자극물질

- (a) 눈 전면에 물질을 적용했을 때 눈에 나타나는 조직 손상으로 적용 후 21 일 이내에 복구되지 않거나 심각한 물리적 시력 감소를 일으키는 화학물질
- (b) UN GHS 카테고리 1 또는 EU CLP 카테고리 1 또는 U.S. EPA 카테고리 I 눈 자극성 물질로 분류된 화학물질

2.4 심한 눈 손상

눈 전면에 시험물질을 적용한 후 21 일 이내에 완전히 회복되지 않는 눈 조직 손상 또는 심각한 물리적 시력의 손상

2.5 플루오레세인 누출

세포층을 통과하는 플루오레세인의 양을 분광형광광도계로 측정

2.6 FL₂₀

세포층을 통과해 20 %의 플루오레세인 누출을 야기하는 시험된 물질의 농도

II. 시험

1. 원리

이 시험은 반투막 인서트에 배양한 세노관상피세포 유래의 MDCK CB997 세포의 융합된 단층(confluent monolayer)에서 증식하지 않는 상태의 생체내 각막 상피의 상태를 모사하는 시험법이며, 세포 독성 및 세포 기능에 기반을 둔 생체의 시험법이다.

2. 시험의 준비

2.1 세포 단층의 제작

- (1) MDCK CB997 세포의 단층은 DMEM/Nutrient Mix F12(1× 농축 L-글루타민, 15 mM HEPES, 칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM), 10 % 열비활성화 FCS/FBS 추가) 배지에서 세포배양 플라스크에 배양한 준 합류(sub-confluent) 세포를 사용하여 제작한다. 중요한 것은 밀착결합(tight junction)의 형성과 완전성을 확보하기 위해서는 FL 시험에 사용되는 모든 배지와 용액은 1.8 mM(200 mg/L)에서 1.0 mM(111 mg/L) 사이의 칼슘을 함유하여야 한다. 균일하고 재현성 있는 밀착결합(tight junctions) 형성을 보장하기 위해 세포 계대수 범위를 관리해야 한다. 바람직하게는 세포는 해동 후 3 ~ 30의 계대수 범위 내로 하는데 이 계대범위 내의 세포는 유사한 기능성을 가지고 있어 재현성 있는 시험결과를 얻는데 도움이 된다.
- (2) FL시험법을 수행하기 전에, 세포를 트립신 처리하여 플라스크로부터 떼어낸 후 원심분리하여 적절한 수의 세포를 24-well 플레이트에 놓인 인서트에 접종한다. 인서트는 두께 80 μm ~ 150 μm , 세공 크기 0.45 μm 인 혼합 셀룰로오스 에스테르 막의 직경 12 mm인 것을 사용한다. 인서트와 막 유형의 특성은 세포 성장과 화학물질 결합에 영향을 줄 수 있으므로 중요하다.
- (3) 양전하를 띠는 인서트 막에 붙는 염화 벤잘코늄과 같은 양이온성 화학물질이 인서트 막과 화학결합을 많이 일으킨다. 인서트 막과 화학물질의 결합은 화학물질 노출 시간을 늘려 화학물질의 독성을 과대평가할 수 있지만, 인서트에 결합된 양이온성 화학물질에 염료가 결합하여 인서트를 통한 플루오레세인 누출을 물리적으로 감소시킬 수도 있어 화학물질의 독성을 과소평가할 수 있다. 이러한 가능성은 세포가 없는 막에 최고 농도의 화학물질을 노출시킨 다음 표준 시간 동안 규정 농도의 플루오레세인나트륨 염료를 첨가함으로써(무세포 대조군) 쉽게 모니터 할 수 있다. 플루오레세인나트륨 염료가 결합되면 시험물질을 세척

후에 인서트 막이 노란색을 띤다. 따라서 세포에 대한 화학물질의 영향을 해석하기 위해 시험물질의 결합 특성을 아는 것이 중요하다.

- (4) 인서트에 접종한 세포는 화학물질에 노출 할 때 합류단층을 만들어야 한다. 인서트 당 4×10^5 cells/mL의 세포를 가한다(1.6×10^5 cells/mL 세포 현탁액 400 μ L). 이 조건 하에서, 융합된 단층은 통상 96 시간 배양 후에 만들어 진다. 인서트는 접종 전에 육안으로 검사한다.
- (5) $5\% \pm 1\%$ 의 CO₂, $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 가 유지된 습윤한 환경의 세포배양기에서 MDCK 세포를 배양한다. 세포는 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 및 곰팡이에 의한 오염이 없다는 것을 확인하여야 한다.

2.2 시험 물질의 조제

- (1) 시험 물질의 원액은 사용시 조제하고, 조제 후 30 분 이내에 사용한다. 시험 물질은 혈청 단백질 결합을 피하기 위해 칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM)을 함유하고 페놀레드 미함유 HBSS에 조제한다. 시험물질이 HBSS에 250 mg/mL로 용해되는지 시험 전에 평가한다. 이 농도에서 화학물질이 30 분에 걸쳐 안정한 현탁액 또는 유제를 형성하면(즉, 균일성을 유지하고 침전되거나 하나 이상의 상으로 분리되지 않음) HBSS를 용매로 사용할 수 있다. 그러나 화학물질이 250 mg/mL 농도에서 HBSS에 불용성인 경우 FL 대신 다른 시험법의 사용을 고려한다. HBSS에 불용성인 것으로 밝혀진 경우, 용매로서 경질 미네랄 오일을 사용하는 것은 신중히 고려하는데 이는 이 조건하에서 FL시험의 신뢰도를 결정할 수 있는 충분한 자료가 없기 때문이다.
- (2) 시험물질은 칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM)을 함유하고 페놀레드 미함유 HBSS에 원액으로부터 희석하여 무게/부피 백분율 기준으로 5 개 고정 농도로 조제한다: 1 mg/mL, 25 mg/mL, 100 mg/mL, 250 mg/mL 및 원액(neat) 또는 포화 용액. 고체 화학 물질을 시험할 때는 750 mg/mL의 최고농도를 추가한다. 이러한 고농도의 화학물질은 고점도용 마이크로 피펫 (positive displacement pipette)을 사용하여 세포에 적용해야 할 경우도 있다. 25 mg/mL ~ 100 mg/mL에서 독성이 확인된 경우 1 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, 75 mg/mL, 100 mg/mL 농도를 추가하여 2 회 시험해야 한다. 시험 성립 기준이 충족되면 이 농도들의 시험결과에서 FL₂₀ 값을 도출한다.

2.3 대조물질

- (1) 매 실험마다 동시대조군(NC)과 동시 양성대조군(PC)을 두고, NC로 세포 단층의 완전성을, PC로는 세포의 감도가 기존의 정의된 허용 범위 내에 있는지를 입증한다. PC는 100 mg/mL의 Brij 35(CAS No. 9002-92-0)를 사용할 것을 권장한다. 이 농도에서 약 30 %의 플루오레세인 누출(허용 범위 20 % ~ 40 %의 플루오레세인 누출, 즉 세포층의 손상)을 유발해야 한다. NC는 칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM)을 함유하고 페놀레드 미함유 HBSS(무처리, 공대조군)를 권고한다. FL₂₀값을 계산할 수 있도록 각 실험에 최대 누출 대조군을 둔다. 최대 누출은 무세포 대조 인서트를 사용하여 측정한다.

3. 시험방법

3.1 시험 물질 및 대조물질의 적용

- (1) 배지를 제거하고 37 °C로 가온한, 칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM)을 함유하고 페놀레드 미함유 HBSS로 두 번 세척 한 후 시험 물질을 합류 세포 단층에 적용한다. 시험에는 각 농도의 시험물질 그리고 대조군에 대해 적어도 3 회 이상 반복 한다. 실온에서 1 분간 노출시킨 후 시험 물질을 조심스럽게 감압흡입하여 제거 하고 위와 같은 HBSS로 세포의 단층을 2 회 세척한 후 플루오레세인 누출을 즉시 측정한다.

3.2 플루오레세인 투과도의 측정

- (1) 시험물질 및 대조물질을 제거한 후 즉시 0.1 mg/mL의 플루오레세인나트륨 용액[칼슘(1.0 mM ~ 1.8 mM)을 함유하고 페놀레드 미함유 HBSS에 0.01 % (w/v)가 되도록 용해] 400 μ L를 Millicell-HA 인서트에 넣는다. 배양한 세포는 30 분 동안 실온에 둔다. 플루오레세인과 배양 후 각 웰에서 인서트를 조심스럽게 꺼낸다. 각 필터와 작업 동안 발생된 손상 정도를 육안으로 확인하여 기록한다.
- (2) 세포의 단층 및 인서트를 통과해 누출 된 플루오레세인의 양은 인서트를 제거한 후 well에 남아 있는 잔류용액에서 정량한다. 측정은 485 nm 여기 파장, 530 nm의 형광 파장에서 분광형광광도계로 실시한다. 분광형광광도계의 감도는 최대 FL(세포가 없는 인서트)과 최소 FL(NC로 처리 한 합류 세포의 단층을 가진 인서트) 차이가 최대가 되도록 설정한다. 또한 사용된 분광형광광도계에 의한 차이 때문에 최대 플루오레세인 누출 대조군의 플루오레세인의 강도가 4,000을 초과하는 정도의 감도를 사용하는 것을 권장한다. 최대 FL 값은 9,999보다 크지

않아야 하며 최대 플루오레세인 누출 강도는 사용된 분광형광광도계의 선형 범위 내에 있어야 한다.

3.3 결과의 해석 및 예측 모델

- (1) FL의 양은 화학물질에 의해 유발된 밀착결합(tight junction)의 손상 정도와 비례한다. 시험물질의 각 농도에 대한 FL의 백분율은 NC(NC를 처리한 합류세포의 단층을 통과한 FL양의 판독치) 및 최대 누출 대조군(무세포 인서트를 통과한 FL양의 판독치)의 FL값을 기반으로, 얻어진 시험물질의 FL값을 참조하여 계산한다.

최대 누출 플루오레세인 강도의 평균 = x

0 % 누출 플루오레세인 강도(NC)의 평균 = y

100 % 누출의 평균은 최대 누출의 평균에서 0 % 누출 평균을 뺀 값이다.

즉, $x - y = z$

- (2) 각 농도의 누출 퍼센트는 3 회 반복 측정된 플루오레세인 강도(m)의 평균에서 0 % 누출 값을 뺀 다음 이 값을 100 % 누출 값으로 나눈 것이다. 즉, $\% FL = [(m - y) / z] \times 100 \%$,

m = 농도에 대한 플루오레세인 형광 강도를 3 회 반복 측정된 것의 평균

$\% FL$ = 세포층을 통과하여 누출된 플루오레세인의 백분율

- (3) 20 % FL을 유발하는 화학물질의 농도를 계산하기 위해 다음의 식을 사용한다.

$$FL_D = [(A - B) / (C - B)] \times (M_C - M_B) + M_B$$

D = 억제 비율 %

A = 손상 비율 %(20 % 플루오레세인 누출)

B = 플루오레세인 누출 % < A

C = 플루오레세인 누출 % > A

M_C = C 의 농도(mg/mL)

M_B = B 의 농도(mg/mL)

- (4) 화학물질이 눈 부식/강한 눈 자극인지 예측하기 위한 FL_{20} 의 기준 값은 아래와 같다.

FL_{20} (mg/mL)	UN GHS C&L	EU CLP C&L	U.S. EPA C&L
≤ 100	카테고리 1	카테고리 1	카테고리 1

※ C&L : 분류 및 표시

- (5) FL 시험법은 수용성 눈 부식물질 및 강한 눈 자극물질(UN GHS 카테고리 1, EU CLP 카테고리 1, U.S. EPA 카테고리 D)을 식별하는 경우에 한정해서 사용할 것을 권장한다.
- (6) 수용성 화학물질(물질 및 혼합물)을 ‘심각한 눈 손상(UN GHS/EU CLP 카테고리 1)’ 이나 ‘눈 부식물질 또는 강한 눈 자극물질(U.S. EPA 카테고리 D)’ 로 판정하기 위해서는 시험물질의 FL₂₀ 값이 100 mg/mL 이하가 되어야 한다.

3.4 시험의 성립조건

- (1) 최대 플루오레세인 누출 값의 평균(x)은 4,000보다 높아야 하며, 0 % 누출 평균(y)은 300 이하여야 하고 100 % 누출 평균(z)은 3,700 ~ 6,000 이어야 한다.
- (2) 양성대조군이 세포층에 20 % ~ 40 %의 손상을 주었을 때(플루오레세인 누출 %로 측정) 그 시험은 성립될 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험자료

- (1) 각 시험 실행에 대해, 각각의 반복 웰의 데이터(예: 플루오레세인 강도 값, 계산된 FL 백분율 데이터, 시험물질의 분류)를 표 형식으로 보고한다. 또한 각 실험에서 반복 측정값의 평균 ± 표준편차를 보고한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과의 보고는 다음 정보를 포함한다.

2.1. 시험물질과 대조물질

- (1) CAS(Chemical Abstracts Service)에서 사용하는 구조명과 같은 화학명(알려진 경우 다른 이름을 뒤에 첨부)
- (2) 화학물질 CAS 번호(알려진 경우)
- (3) 알려진 범위에서 물질 또는 혼합물의 순도 및 조성(중량 백분율)
- (4) 시험의 실시와 관련된 물리화학적 특성(예: 물리적 성상, 휘발성, pH, 안정성, 수용성, 화학적 분류)
- (5) 시험 전 시험물질과 대조물질의 처리 방법(해당되는 경우)(예: 가온, 분쇄);
- (6) 저장 조건

2.2 시험법 및 사용 된 프로토콜의 타당성

- (1) 적용 영역 및 시험법의 한계에 관한 고려 사항을 포함한다.

2.3 시험조건

- (1) 이용한 세포주에 대한 설명(세포주의 인증서와 마이코플라즈마 유무를 포함)
- (2) 사용된 시험 절차의 세부 사항
- (3) 사용된 시험물질의 농도
- (4) 시험물질의 노출 시간
- (5) 플루오레세인의 배양 시간
- (6) 시험절차를 수정한 경우 그에 대한 설명
- (7) 사용된 평가 기준에 대한 설명
- (8) 모델의 기존 데이터(예: 음성 및 양성 대조군, 기준 물질(해당하는 경우))
- (9) 실험기관에서 수행된 기술적 숙련도에 대한 정보

2.4 결과

- (1) 각 실험 수행에서 반복 측정된 시험물질 및 대조군의 도표화된 데이터(개별 결과, 평균 및 표준편차 포함)
- (2) 사용된 예측 모델 및/또는 판정 기준에 따른 분류
- (3) 관찰된 기타 영향에 대한 설명

2.5. 결과의 토의

- (1) 확정적이지 않은 결과($FL_{20} > 100 \text{ mg/mL}$) 및 추가 시험에 관한 고려 사항을 포함한다.

2.6 결론

제57항 생체의 포유류 세포 소핵시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 인간 또는 설치류 기원의 배양 세포주 또는 일차 배양 세포에 사용시험 물질을 처리하고, 간기세포의 세포질에서 소핵을 검출함으로써, 시험물질에 의한 생체의 염색체 손상 가능성을 규명하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1. 이수성 유발물질

유사분열 및 감수분열 주기 기관의 구성요소와 상호 작용하여 세포 또는 생명체에 서 이수성을 유도하는 모든 물질 또는 과정

2.2. 이수성

염색체의 정상적인 이배체(또는 반수체) 수에서 하나 혹은 그 이상의 일탈. 염색체 전체의 배수체는 포함하지 않음

2.3. 염색체 절단물질

세포 혹은 진핵생물 개체군에서 구조적 염색체 이상을 야기하는 모든 물질 또는 사건

2.4. 세포질 분열

유사분열 직후에 세포분열 과정을 통해 각각 하나의 핵을 포함하는 두 개의 딸세포를 형성하는 과정

2.5. 세포질 분열 억제 증식 지표(CBPI)

처리된 군에서의 2 차 분열 세포를 미처리군과 비교한 비율(부록 참고)

2.6. 세포독성

이 시험법에서는 cytochalasin B(cytoB) 존재 시험 조건에서 음성대조군과 비교하여

처리된 세포의 CBPI 또는 복제지수(replication index, RI)로 세포독성을 정의(부록 참고). CytoB 부재 시험 조건에서는, 음성대조군과 비교하여 처리된 세포의 상대적 집단 배가(relative population doubling, RPD) 또는 상대적 세포 수 증가(relative increase in cell count, RICC)의 감소로 세포독성을 정의(부록 참고).

II. 시험

1. 원리

인체 혹은 다른 포유류 기원의 세포에 시험물질이 노출되는 동안, 혹은 노출된 후 염색체 손상을 일으키거나 세포주기/세포분열에 영향을 주어 간기세포에서 소핵 형성을 유도하는지 평가한다. 소핵은 비중추성 염색체 파편(즉, 중심립이 결여된 것), 또는 세포분열 후기에 극으로 이동할 수 없는 온전한 염색체로부터 생성될 수 있다. 이수성유발물질(aneugen) 및 염색체절단물질(clastogen)이 확인될 수 있으므로, 생체 외 소핵시험은 염색체 손상 가능성을 조사하기 위한 포괄적인 기초를 제공하는 생체 외 시험방법이다. 세포질분열 억제제인 cytochalasin B(cytoB)가 포함되거나 포함되지 않은 시험법에서, 한 번의 유사분열만을 완료한 세포에서의 소핵 확인이 가능하도록 한다. 또한, 대상 세포가 시험물질을 대사할 능력이 없다면, 필요에 따라 외인적 대사활성화 체계를 사용하도록 한다.

2. 시험의 준비

2.1. 세포 및 배양조건

- (1) 일차 세포로 배양된 인간 또는 다른 포유류 말초 혈액 림프구 혹은 CHO, V79, CHL/1U 및 L5178Y 세포와 같은 여러 설치류 세포주 혹은 TK6와 같은 인간 세포주가 사용될 수 있다. 타당한 세포주 및 유형을 사용하도록 한다. CytoB는 잠재적으로 L5178Y 세포 성장에 영향을 미치므로 이 세포주에는 권장되지 않는다.
- (2) 인간 말초 혈액 림프구는 대략 18 세 ~ 35 세의 젊은 나이이면서, 소핵세포의 배경발생률을 증가시킬 수 있는 수준의 유전독성 물질(예를 들면, 화학 물질, 전리 방사선)에 대해 최근에 노출된 적이 없고, 알려진 질병이 없는 비흡연자로부터 확보한다.
- (3) 적절한 배양 배지 및 배양 조건(배양 용기, 5 % CO₂의 습한 조건, 37 °C)이 사용되어야 한다. 세포주는 다빈도 염색체 수(modal chromosome number)가 안정한지와 마이코플라즈마 오염이 없는지 정기적으로 점검한다. 실험실에서 사용

되는 세포주 또는 일차 세포 배양의 정상적인 세포주기 시간을 점검하며 기존에 알려진 세포 특성과 일치하는지 확인한다.

- (4) 세포주의 경우, 보존 배양(stock culture)으로부터 세포를 증식시키고, 대수증식할 수 있는 밀도로 부유세포를 배양액에 현탁하거나, 부착세포를 단일층으로 배지에 배양한다. 림프구의 경우, 헤파린 등의 항응고제를 처리한 전혈, 또는 분리 배양된 림프구에서 세포 분열을 유도하기 위해, 유사분열 촉진제(인간 림프구의 경우, phytohaemagglutinin, PHA) 존재 하에 배양한 후, 시험물질이나 cytoB에 노출시킨다.

2.2. 시험물질의 조제

고체물질은 적절한 용매나 보조제를 사용하여 용해 또는 분산시켜 사용한다. 액체 물질은 직접 사용하거나 적절히 희석하여 사용한다. 조제된 시험물질의 안정성 자료가 확보되지 않은 경우, 시험 직전에 조제한다.

2.3. 용매 또는 용제의 사용

용매 또는 용제는 시험계에 영향을 미치지 않으면서 시험물질의 용해도를 최적화하도록 선택한다. 가능하면 수용성 용제(또는 배양액) 사용을 먼저 고려하며, 물이나 디메틸설폭사이드(DMSO)가 타당하다. 일반적으로, 유기용제의 총량이 1 %(v/v)를 초과하지 않도록 한다. 수용성 용제(식염수 또는 물)는 최종 처리 배양액에서 10 %(v/v)를 초과하지 않도록 한다.

2.4. 대사활성화 체계의 사용

내인성 대사 능력이 적절하지 못한 세포를 사용할 경우 외인성 대사활성화 체계를 사용한다. 일반적으로, Aroclor 1254 혹은 페노바비탈/ β -나프토플라본 조합과 같은 효소 유도제로 처리한 설치류의 간 추출물에서 얻은 후 미토콘드리아 분획에 조효소가 보충된 상층액인 S9을 이용한다. S9 분획은 대개 1 % ~ 2 %(v/v)의 농도로 사용한다.

2.5. CytoB와 같은 세포질분열 억제제의 사용

- (1) 본 시험에서는 시험물질 처리 중, 혹은 처리 후 기간 동안 세포가 유사분열을 완료하였는지가 중요하다. 소핵 계수는 시험물질 처리 중 혹은 처리 후 유사분

열을 진행한 세포로 제한되어야 한다. CytoB는 액틴 중합을 억제하여 세포질분열을 차단하는 데 널리 사용되는 물질이다. 세포증식과정에 대한 시험물질의 효과는 cytoB가 사용될 때 동시에 측정될 수 있다.

- (2) 인간 림프구가 사용되는 경우, cytoB를 반드시 세포질분열 억제제로 사용해야 하는데, 이는 림프구 공여자 사이에서 세포주기가 다를 수 있고, 모든 림프구가 PHA 자극에 반응하지는 않기 때문이다. 유세포분석법으로 소핵을 평가할 때에는 일반적으로 cytoB를 사용하지 않는다.
- (3) CytoB의 적절한 농도는 용제 대조군 배양에서 이핵세포의 최적 빈도를 달성하기 위해 각 세포 유형에 대하여 결정되어야 하는데, 보통 $3 \mu\text{g/mL} \sim 6 \mu\text{g/mL}$ 를 이용한다.

3. 시험방법

3.1. 처리농도의 선택

- (1) 시험물질의 최고농도를 결정할 때, 과도한 세포독성, 배양액에서의 침전, pH 또는 삼투압의 현저한 변화와 같은 인위적 양성 반응을 유발하지 않는지 고려한다.
- (2) 세포증식을 측정하여, 시험물질이 충분하게 처리된 세포가 시험 중 유사분열을 겪었으며, 적절한 수준의 세포독성 수준으로 수행되었는지 확인한다. 필요에 따라, 초기 예비 시험에서 세포독성을 평가하여 본 실험에서의 사용 농도 결정에 활용할 수 있다.
- (3) 세포 배양에서 cytoB를 처리하고 단핵, 이핵세포 및 다핵세포의 상대적 빈도를 측정하여 세포증식 및 세포독성 또는 세포증식억제효과를 정확하게 정량하며, 처리 중 또는 처리 후에 분열한 세포만을 현미경으로 계수하도록 한다. 배양액 당 최소 500 개의 세포에서 세포질분열 억제 증식 지수(CBPI) 또는 복제지수(RI)를 사용하여 처리군 및 대조군의 값을 비교하여 처리군의 세포 독성 및 세포증식 억제 효과를 평가한다. 세포독성의 다른 지표(예를 들면, 세포 온전성, 세포사멸, 괴사, 중기 수, 세포주기)를 평가한다면 유용한 정보를 얻을 수 있지만 이들 지표를 CBPI 또는 RI 대신 사용해서는 안 된다.
- (4) CytoB를 사용하지 않는 경우, 시험물질로 처리하는 동안 또는 처리한 후에 상당부분의 세포가 분열하였음을 입증해야 하며, 그렇지 않으면 위음성 반응이 나올 수 있다. 상대적 집단 배가(RPD) 또는 상대적 세포 수 증가(RICC)의 측정은

시험물질 처리의 세포독성 및 세포증식억제활성을 평가하는 데 권장된다(공식은 부록 참고).

- (5) 적어도 세 가지 농도를 평가해야 한다. 시험된 각각의 농도에서 반복 또는 단일 배양이 사용될 수 있다. 세포독성을 거의 보이지 않거나 전혀 나타내지 않는 시험물질의 경우, 약 2 배 ~ 3 배의 농도 간격이 적합하다. 세포독성이 나타나는 경우, 세포독성 농도부터 세포독성이 없는 농도까지 범위를 설정한다.
- (6) 최대 농도가 세포독성에 근거한 경우, 가장 높은 농도는 권장된 세포독성 지표를 사용하여 $55 \% \pm 5 \%$ 정도의 세포독성을 달성하는 것을 목표로 한다.
- (7) 난용성 시험물질의 경우, 분석된 최고 농도는 시험물질로 처리한 후에 혼탁 또는 눈이나 현미경을 사용하여 볼 수 있는 석출물을 생성하는 농도로 한다. 침전물로 인해 인위적 효과가 생길 수 있으므로, 혼탁 혹은 침전을 유발하는 농도는 한 가지만 시험하도록 한다.
- (8) 침전물이나 세포독성에 의한 제한이 관찰되지 않으면, 가장 높은 시험 농도는 10 mM, 2 mg/mL 또는 2 μ L/mL 중 가장 낮은 값으로 설정한다. 시험물질 조성이 결정되지 않은 경우, 즉, 알려지지 않은 물질, 복잡한 반응 생성물이나 생물학적 물질(UVCB), 환경 추출물 등의 경우에는 세포독성이 없다면 더 높은 최고 농도(예를 들면, 5 mg/mL)를 사용할 수도 있다.

3.2. 대조군

시험마다 동시에 수행되는 양성과 음성대조군을 포함하도록 한다. 음성대조군은 매 채취 시마다 포함하도록 한다.

3.2.1. 음성대조물질

처리 배지에서 용매로만 구성되고 처리 배양과 동일한 방식으로 처리한다.

3.2.2. 양성대조물질

- (1) 시험 조건과 외인성 대사활성화 체계(해당되는 경우)가 이수성유발물질 및 염색체절단물질 규명에 적합한지 확인하도록 양성대조물질을 이용한다. 양성대조물질의 예는 표 1에 수록되어 있다.
- (2) 현재 유전독성 활성을 위해 대사활성화가 요구되는 이수성유발물질은 알려져 있지 않다. 표준화된 단기 처리 시험에서 양성대조군의 사용은 대사활성화가

필요한 염색체절단물질에 국한될 수 있지만, 대사활성화 체계가 없는 장기간 처리는 자체적인 양성대조군이 필요할 수도 있다. 대사활성화 존재 및 부재 하에, 단기간 처리를 위한 단일 양성대조군으로 염색체절단물질을 이용한다면, 대사활성화 없이 장기간 처리를 위해 이수성유발물질을 선택할 수 있다. 염색체 이상유발성과 이수체유발성 두 가지를 모두 검토하기 위한 대한 양성대조군은 대사적 활성이 있는 세포에서 사용한다.

- (3) 각각의 양성대조물질은 명확한 효과를 나타내는 하나 이상의 농도에서 사용해야 하며, 반응은 이 시험지침에 명시된 한계를 초과하는 세포독성에 의해 손상되지 않아야 한다.

표 1. 양성대조물질의 예

범주	물질	CAS 번호
1. 대사적 활성이 요구되지 않는 염색체절단물질		
	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-Oxide	56-57-5
	Cytosine arabinoside	147-94-4
2. 대사적 활성이 요구되는 염색체절단물질		
	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
3. 이수성유발물질		
	Colchicine	64-86-8
	Vinblastine	143-67-9

3.2.3. 기존 대조군 시험자료

각 시험기관에서는 기존의 양성대조군의 범위와 분포, 기존의 음성(미처리, 용제)대조군의 범위와 분포를 확인한다.

3.3 시험물질의 처리 및 일정

- (1) 세포주기의 특정단계에서 작용하는 이수성유발물질 또는 염색체절단물질을 검출할 확률을 최대화하기 위해 세포주기의 다양한 단계를 포함하는 충분한 수의

세포를 시험물질로 처리하는 것이 중요하다. 모든 시험물질의 처리는 세포가 대수증식하는 동안 시작되고 끝나야 하며 세포는 시료채취 시간까지 계속 증식해야 한다. 림프구의 경우, 유사분열촉진을 위하여 PHA 자극 후 44 시간 ~ 48 시간에 시험물질 처리를 시작하는 것이 좋다.

(2) 일반적으로, 다음의 세 가지 시험조건 모두에서 시험을 수행한다.

- 3 시간 ~ 6 시간 동안 대사활성화 체계 없이 세포에 시험물질을 처리하고, 처리시작 후 약 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간에 시료를 채취
- 3 시간 ~ 6 시간 동안 대사활성화 체계와 함께 세포에 시험물질을 처리하고, 처리시작 후 약 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간에 시료를 채취
- 약 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이에 해당하는 시간 동안 대사활성화 없이 지속적으로 시험물질을 처리하고, 시료를 채취

(3) 위의 시험조건 중 하나라도 양성반응을 보이는 경우 다른 처리요법을 조사할 필요가 없다.

(4) 시험물질이 세포주기에 영향을 주는 등, 필요한 경우에는 시료채취나 회복 시간을 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이까지 연장할 수 있다. 이때에는 시험물질 처리시작 후 총 3.0 ~ 4.0 세포주기 길이에 시료를 채취하게 된다.

(5) CytoB 사용 여부, 대사활성화 체계(S9) 사용 여부에 따른 처리 및 채취시간은 다음 표 2와 같다.

표 2. 생체의 소핵시험을 위한 세포 처리 및 채취 시간

cytoB로 처리한 림프구, 일차 세포, 세포주	+ S9 단기처리	S9가 있는 상태에서 3 시간 ~ 6 시간 동안 처리; S9와 처리 배양액을 제거; 신선한 배양액 및 cytoB 첨가; 처리 시작 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이 후 채취
	- S9 단기처리	3 시간 ~ 6 시간 동안 처리; 처리 배양액을 제거; 신선한 배양액 및 cytoB 첨가; 처리 시작 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이 후 채취
	- S9 연장된 처리	cytoB 존재 하에 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기 길이로 처리; 처리 기간이 끝나면 채취
cytoB로 처리하지 않은 세포주 (cytoB가 첨가되지 않는 것을 제외하고는 위에서 설명한 처리 일정과 동일)		

3.4 세포채취 및 슬라이드 준비

- (1) 각각의 배양 시료를 따로 채취하여 각각 처리한다. 저 삼투압 처리 또는 적절한 세포 도말을 수행한다. 소핵 검출과 이핵세포(세포질분열 억제 방법에 의한)의 확실한 동정을 위해 손상되지 않은 세포막과 세포질이 있는 세포가 유지되도록 한다.
- (2) 슬라이드는 김자액(Giemsa) 또는 형광 DNA 특이 염료와 같은 다양한 방법을 사용하여 염색할 수 있다. 소핵형성의 기전적인 정보가 필요한 경우, 적절한 추가적인 염색을 이용할 수 있다. 염색체절단물질과 이수성유발물질 사이의 구별을 위한 다른 방법은 효과와 유효성이 입증된 경우에 사용할 수 있다.

3.5 분석

- (1) 용제 처리군 및 미처리 군, 양성대조군을 포함한 모든 슬라이드는 소핵 빈도 현미경 분석 전에 각각 코딩한다. 유세포분석법, 레이저 스캐닝 세포계측 또는 이미지 분석 등 자동 계수 시스템에서 적절한 기술을 이용하여 편파적 판정을 피한다.
- (2) 농도와 대조군 당 적어도 2,000 개의 이핵세포에서 소핵 빈도를 분석하며, 반복을 사용하는 경우 배양 간에 균등하게 나눈다. 투여군 당 단일배양의 경우에는 배양액 당 적어도 2,000 개의 이핵세포를 계수한다. 소핵에서 유의한 증가가 검출되지 않는다면 더 많은 세포를 사용하든 혹은 적은 세포독성 농도로 하든 적절한 쪽으로 시험을 반복한다. 불규칙한 모양의 이핵세포 혹은 두 핵의 크기가 매우 다른 세포를 계수하지 않도록 주의한다. 또한, 이핵세포를 잘 분산되지 않은 다핵세포와 혼동하지 않도록 한다. 2 개 이상의 주요 핵을 함유하는 세포에서는 기준 소핵 빈도가 더 높을 수 있으므로 이들 세포는 소핵에 대해 분석해서는 안 된다.
- (3) CytoB가 사용될 때, CBPI 또는 RI는 배양 당 적어도 500 개의 세포를 사용하여 세포증식을 평가한다(부록 참고). CytoB가 없는 상태에서 처리가 수행될 경우에는 배양된 세포가 분열되었다는 증거를 제공하도록 한다.

3.6 숙련도 확인

- (1) 시험기관은 다른 기전으로 작용하는 양성대조물질과 다양한 음성대조군으로(미처리 배양 및 다양한 용제/용매 포함) 일련의 시험을 수행해야 한다. 이러한 양성 및 음성대조 결과는 기존 문헌과 일치해야 한다.

- (2) 염색체이수성과 염색체이상유발능을 가진 물질의 검출의 적절성, 대사활성화 체계의 유효성, 계수 방법의 타당성을 입증하기 위해서 양성대조물질에 의한 영향은 대사활성화가 없을 때 단기 처리와 연장된 처리로 확인하며, 또한 대사활성화가 있는 상태에서는 단기 처리로 확인한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과

1.1 시험결과의 처리

- (1) CytoB를 사용할 경우, 세포 당 소핵의 수에 관계없이 소핵을 가진 이핵세포의 빈도가 소핵유도평가에 사용된다.
- (2) 모든 처리군 및 음성, 양성대조군에서 세포독성 및/또는 세포성장 억제를 측정한다. CytoB가 사용되는 경우, 세포주기 지연의 측정으로 CBPI 또는 RI를 모든 처리 및 대조 배양에 대해 계산해야 한다. CytoB가 없는 경우, RPD 또는 RICC를 사용한다(부록 참고).
- (3) 각 배양군에 대한 자료를 개별적으로 제시한다. 또한 모든 시험자료를 표로 요약한다.

1.2 시험결과의 해석

- (1) 시험의 성립조건이 충족되고 어느 한 처리조건에서라도 시험결과가 다음의 모든 조건을 만족할 경우, 시험물질은 염색체 파손 및/또는 획득 또는 소실을 유도할 수 있는 양성으로 간주한다.
 - 시험 농도 중 적어도 하나는 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타냄
 - 적절한 추세 분석에서, 적어도 하나의 시험조건에서 소핵 증가가 용량과 연관함
 - 결과 중 하나라도 기존 음성대조군 자료의 분포 밖에 있음
- (2) 시험의 성립조건이 충족되고 모든 처리조건에서 시험결과가 다음의 모든 조건을 만족할 경우, 시험물질은 염색체 파손 및/또는 획득 또는 소실을 유도할 수 없는 음성으로 간주한다.
 - 시험 농도 중 어느 것도 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않음
 - 적절한 추세 분석에서, 농도-증가반응이 연관된다는 증거가 없음
 - 모든 결과는 기존 음성대조군 자료의 분포 안에 있음

- (3) 위에 기술된 바와 같이 반응이 명백하게 음성 또는 명백하게 양성이 아닌 경우에는, 결과의 생물학적 관련성 확립을 돕기 위해 전문가 판단 및/또는 추가 조사가 필요할 수 있다. 추가 세포를 계수하거나, 수정된 시험조건(예를 들면, 농도 간격, S9 농도 또는 S9 기원 등 다른 대사활성화 조건)을 사용하여 반복 시험을 수행하는 것이 유용할 수 있다.
- (4) 추가 시험 후에도 시험자료가 양성 혹은 음성의 결론을 내리지 못하여 모호한 것으로 결론 내릴 수 있다.

2. 시험의 성립조건

수행한 시험은 다음 기준이 충족되어야 한다.

- 동시 음성대조군의 결과가 시험기관 내 기존 음성대조군 시험자료에 추가될 수 있음
- 동시 양성대조군 결과가 시험기관의 기존 양성대조군 시험자료와 일치하는 반응을 나타내며 동시 음성대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 증가를 나타냄
- 용제대조군에서 세포증식 기준이 충족됨
- 적어도 한 군에서 결과가 양성이지 않을 경우 모든 시험조건을 검토함
- 적절한 세포 수와 농도를 분석함
- 최고 농도의 선택 기준이 타당함

3. 시험결과의 보고

시험결과의 보고는 다음 정보를 포함한다.

3.1. 시험물질

3.1.1. 물질데이터(출처, 순도, 로트 번호 등)

3.1.2. 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도 등)

3.1.3. 배양액과의 반응성 및 시험물질이 첨가된 배양액에서의 pH, 삼투압, 침전물 등

3.1.4. 단일성분물질의 경우 다음 자료

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI코드, 구조식, 그 외의 확보 가능한 물질정보
- (2) 물리적인 성상, 수용해도, 관련 물리·화학적 성질
- (3) 순도, 불순물의 확인

3.1.5. 다성분으로 이루어진 물질, UVCB(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials)와 혼합물의 경우 다음 자료

- (1) 위에서 언급한 물질의 화학적 정체
- (2) 구성성분의 정량적 구성 및 관련 물리화학적 성질

3.2. 용매(용제)

3.2.1. 용매의 출처, 순도

3.2.2. 용매선정의 논리적 근거

3.2.3. 최종 배양액 중 백분율

3.3. 세포

3.3.1. 사용된 세포의 유형 및 기원, 타당성

3.3.2. 세포주의 경우, 세포주기 길이 또는 증식지수에 대한 정보, 마이코플라스마 유무에 대한 정보, 계대 수, 배양 방법, 다빈도 염색체 수(modal chromosome number)

3.3.3. 림프구가 사용되는 경우, 혈액기증자의 성별, 연령 및 기증자 관련 정보, 전혈 또는 분리된 림프구, 사용된 유사분열촉진제

3.3.4. 정상(음성대조군) 세포주기 시간

3.4. 시험조건

3.4.1. 시험물질 조제와 처리에 관한 세부사항

3.4.2. 배양액에 첨가된 용제 및 시험물질의 농도(및/또는 부피)

3.4.3. 배양액의 최종 농도로 표시되는 시험물질의 농도(예를 들면, μg 또는 mg/mL 또는 배양액의 mM)

3.4.4. 사용되는 경우, 세포질분열 억제물질(예를 들면, cytoB)의 동정 및 세포 노출의 농도 및 기간

3.4.5. 세포독성 시험자료 및 용해도 제한을 포함한 농도 및 배양 수의 선택에 대한 이론적 근거

3.4.6. 배지 구성, CO_2 농도, 습도 수준

3.4.7. 배양 온도 및 시간, 시험물질 처리 시간, 처리 후 채취 시간

3.4.8. 대사활성화 체계의 유형 및 구성(S9의 출처, S9 혼합물의 준비 방법, 최종 배양액에서의 S9 및 S9 혼합물의 농도 또는 부피, S9의 품질 관리

- 3.4.9. 양성 및 음성대조물질, 최종농도, 처리 기간 및 회복 기간 및 조건
- 3.4.10. 슬라이드 준비 방법 및 사용된 염색 기술
- 3.4.11. 소핵세포의 계측 기준(분석 가능한 세포의 선택 및 소핵의 확인)
- 3.4.12. 분석된 세포의 수
- 3.4.13. 세포독성 및 사용된 방법과 관련된 보충 정보
- 3.4.14. 양성, 음성 또는 모호한 결과로 간주하기 위한 기준
- 3.4.15. 소핵이 전체 또는 파편화된 염색체를 포함하는지 여부를 확인하기 위한 동원체 항체 또는 범-중심립 특이적 탐침의 사용과 같은 방법

3.5. 결과

- 3.5.1. 분석을 위한 허용 가능한 세포의 규정
- 3.5.2. CytoB가 없는 경우, 처리된 세포의 수 및 세포주의 경우 각 배양에 대해 채취된 세포의 수
- 3.5.3. 사용된 세포독성의 측정, 예를 들어, 세포질분열 억제 방법의 경우 CBPI 또는 RI; 세포질분열 억제 방법이 사용되지 않을 때 RICC 또는 RPD; 혹은 세포배양 밀도, 세포사멸, 괴사, 중기 수, 이핵세포 빈도 등 기타 방법
- 3.5.4. 침전의 징후와 확인 시간
- 3.5.5. 세포질분열 억제 방법이 사용되는 경우 단핵, 이핵, 다핵세포의 분포
- 3.5.6. 각각의 처리 및 대조 배양에 대해 개별적으로 주어진 소핵을 갖는 세포의 수 및 이핵세포 혹은 단핵세포로부터 나왔는지의 결정
- 3.5.7. 가능한 경우 농도-반응 상관관계
- 3.5.8. 동시 음성대조군(용제) 및 양성대조군 시험자료(농도 및 용제)
- 3.5.9. 범위, 평균 및 표준편차와 분포의 95 % 통제한계 및 시험자료의 수를 포함한 기존 음성대조군(용제) 및 양성대조군 시험자료
- 3.5.10. 통계 분석 방법

3.6. 결과의 토의

3.7. 결론

부록

세포독성평가를 위한 공식

1. CytoB 를 사용하는 경우, 세포독성의 평가는 세포질분열 억제 증식 지표(Cytokinesis-Block Proliferation Index; CBPI) 또는 복제지수(Replicative Index; RI)를 기반으로 한다. CBPI는 세포 당 핵의 평균 개수를 나타내며, 세포증식을 계산하는 데 사용될 수 있다. RI 는 대조 배양과 비교하여 처리된 배양에서 cytoB 에 노출된 기간 동안 세포 당 세포주기의 상대적 수를 나타내며 % 세포성장억제를 계산하는데 사용될 수 있다:

$$\% \text{ 세포성장억제 (Cytostasis)} = 100 - 100(CBPI_T - 1) \div (CBPI_C - 1)$$

T = 시험물질 처리군

C = 대조군

여기에서

$$CBPI = \frac{((\text{단핵세포 수}) + (2 \times \text{이핵세포 수}) + (3 \times \text{다핵세포 수}))}{(\text{전체 세포 수})}$$

따라서, 1 의 CBPI는 100 % 세포성장억제와 동일함(모든 세포는 단일 핵체임을 의미함).

$$Cytostasis = 100 - RI$$

$$RI = \frac{((\text{이핵세포 수}) + (2 \times \text{다핵세포 수})) \div (\text{전체 세포 수})_T}{((\text{이핵세포 수}) + (2 \times \text{다핵세포 수})) \div (\text{전체 세포 수})_C} \times 100$$

T = 시험물질 처리군

C = 대조군

2. 따라서, 53 %의 RI는 대조배양에서 분열하여 이핵 및 다핵세포를 형성한 세포의 수와 비교하여 처리된 배양에서 이의 53 %만이 분열하였음을, 즉 47 %의 세포성장억제를 의미한다.
3. CytoB 가 사용되지 않는 경우, 상대적 세포 수 증가(RICC) 또는 상대적 집단 배가(RPD)에 근거한 세포독성의 평가가 권장되며, 둘 다 분열된 세포 집단의 비율을 고려한다.

$$RICC = \frac{(\text{처리한 배양에서 세포수의 증가 (최종 - 시작)})}{(\text{대조배양에서 세포수의 증가 (최종 - 시작)})} \times 100$$

$$RPD = \frac{(\text{처리한 배양에서 집단배가수})}{(\text{대조배양에서 집단배가수})} \times 100$$

여기에서

집단배가(Population Doubling) = $[\log(\text{처리 후 세포 수} \div \text{초기 세포 수})] \div \log 2$

4. 따라서, 53 %의 RICC 또는 RPD 는 47 % 세포독성/세포성장억제를 나타낸다.
5. 증식지수(PI)를 사용하여 1 개의 세포(cl1), 2 개의 세포(cl2), 3 내지 4 개의 세포(cl4) 및 5 개 ~ 8 개의 세포(cl8)로 구성된 클론의 수를 세어 세포독성을 평가할 수 있다.

$$\text{증식지수 (PI)} = \frac{((1 \times cl1) + (2 \times cl2) + (3 \times cl4) + (4 \times cl8))}{(cl1 + cl2 + cl4 + cl8)}$$

6. PI는 cytoB 부재 하에 생체외에서 배양된 세포주에 대해서도 중요하고 신뢰할 수 있는 세포독성 지표로 사용되어 왔고, 유용한 추가 지표로 간주될 수 있다.

어떤 경우라도, 처리 전 세포 수는 처리군 및 음성대조군 세포에서 동일해야 한다.

기존에는 세포독성 지표로써 RCC(즉, 처리된 배양에서의 세포 수/대조 배양에서의 세포 수)가 사용되었지만, 세포독성을 과소평가할 수 있기 때문에 더 이상 권장하지 않는다.

자동화된 계측시스템, 예를 들어, 유세포분석법, 레이저 스캐닝 세포계측 또는 이미지 분석을 사용할 때, 공식의 세포 수는 핵의 수로 대체될 수 있다.

음성대조 배양에서, 약 1.5 ~ 2.0 정상 세포주기와 동등한 시간에 처리한 후에 세포를 채취하는 요건을 만족하는 경우, 집단배가 또는 복제지수는 호환되어야 한다.

제58항 형질전환 설치류 체세포 및 생식세포 유전자돌연변이분석법

I. 개요

1. 목적

이 시험은 시험물질을 투여한 형질전환 설치류의 체세포 및 생식세포에서 유전자를 추출하여 생체 내 발생하는 다양한 유형의 돌연변이를 분석함으로써 시험물질에 의한 유전자 돌연변이를 규명하는 데 목적이 있다.

2. 정의

2.1 형질전환 설치류

다른 종의 유전자 또는 유전자의 전이에 의해 유전체가 변경된 랫드 혹은 마우스

2.2 리포터유전자

돌연변이 유전자 산물이 쉽게 검출되는 유전자

2.3 집락형성단위

살아있는 세균 수의 척도

2.4 플라크형성단위

살아있는 박테리오파지 수의 척도

II. 시험

1. 원리

형질전환 설치류(Transgenic Rodent, TGR)를 이용한 체세포 및 생식세포 유전자 돌연변이 분석법은 유전자 돌연변이에 대한 생체 내 시험이다. 기본원리는 형질전환 설치류에 시험물질을 투여한 후, 설치류 조직에서 회수한 유전자를 박테리오파지 혹은 플라스미드 셔틀벡터로 처리하고, 박테리아 숙주에서 확인되는 플라크형성단위(pfu) 또는 집락형성단위(cfu), 돌연변이 수 및 빈도를 측정함으로써 시험물질에 의해 발생하는 돌연변이를 검출하는 것이다. 돌연변이원에 의한 형질전환 유전자에서의 염기쌍치환(base pair substitution), 틀이동돌연변이

(frameshift mutation), 결실(deletion)과 삽입(insertion) 등의 돌연변이 양상은 내인성 유전자에서의 돌연변이 양상과 유사하다는 것을 근거로 한다.

2. 시험의 준비

2.1 실험동물

(1) 돌연변이 검출을 위해 권장되는 형질전환 모델은 lacZ 박테리오파지 마우스 및 lacZ 플라스미드 마우스, lacI 마우스 및 랫드, gpt delta 마우스, gpt delta 랫드 등이 있다. 다양한 형질전환 마우스가 랫드보다 널리 사용되지만, 시험 목적에 따라 랫드를 이용하기도 한다. 일반적으로 시험물질 처리 시 생후 8 주령 ~ 12 주령 정도의 설치류를 사용한다. 동물의 체중은 평균 체중으로부터 20 %를 넘지 않아야 한다.

(2) 실험동물은 집단으로 사육하며 사육실 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도는 30 % ~ 70 %가 유지되도록 한다. 사육실 청소시간 이외에는 가능한 습도를 50 % ~ 60 %로 조절한다. 사료는 일반적인 실험동물 사료를 사용하고, 음용수와 함께 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다. 조명은 인공적으로 조절하며 명/암 주기를 12 시간 간격으로 설정한다.

(3) 전형적인 시험은 투여군(3 개의 용량군), 동시양성대조군과 동시음성대조군으로 구성되며 군당 최소 5 마리로 구성한다. 시험 전 최소 5 일 이상의 순화 기간을 두며, 대개 수컷을 이용하되, 시험 목적에 따라 암컷을 사용하기도 한다. 각 동물의 식별을 위해 개개의 동물에 표시한다.

2.2 시험물질의 조제

고체물질은 적절한 용매나 보조제를 사용하여 용해 또는 분산시켜 사용한다. 액체물질은 직접 사용하거나 적절히 희석하여 사용한다. 조제된 시험물질의 안정성 자료가 확보되지 않은 경우, 시험 직전에 조제한다.

2.3 용매 또는 보조제의 사용

용매 또는 보조제는 투여한 농도에서 독성이 없고 동시에 시험물질과 화학적 반응을 하지 않아야 한다. 먼저 수용성인 용매 또는 보조제의 사용을 고려하도록 한다. 잘 알려진 용매 또는 보조제 이외의 것을 사용할 경우, 이들 사용의 적절성을 증명할 수 있는 자료를 제시한다.

3. 시험방법

3.1 용량

시험물질에 대한 독성정보가 부족할 경우, 투여용량을 결정하기 위한 용량 결정시험을 수행할 수 있다. 시험물질이 용량결정시험의 결과나 한계용량시험의 결과 또는 기존 자료에 근거하여 시험용량에서 유전독성을 나타내지 않을 것으로 판단되는 경우에는 3개 용량군 모두에 대해 시험할 필요가 없다. 28 일 시험에서의 최고용량(한계용량)은 1,000 mg/kg/day로 하고, 14 일 또는 그 이하에서의 최고용량은 2,000 mg/kg/day로 한다. 시험물질이 독성을 일으킨다면, 투여되는 최고용량은 최대내성용량(maximum tolerated dose, MTD)으로 하며 용량 수준은 최대용량에서부터 독성을 약간 일으키거나 일으키지 않는 용량까지의 범위를 포함하도록 한다.

3.2 대조군

시험마다 동시에 수행되는 양성(용매 또는 보조제) 대조군을 포함하도록 한다. 또한, 과거대조군 데이터를 구축해야 하며, 조직 및 종마다 대조군 범위를 확립한다.

3.2.1 음성대조물질

시험군에서 시험물질을 투여하는 데 용매 또는 보조제를 사용한다면 음성대조군에는 동일한 용매 또는 보조제를 투여한다.

3.2.2 양성대조물질

양성대조물질은 시험물질이 하나 혹은 그 이상의 관심 조직에서 돌연변이를 유발한다고 알려진 물질을 이용한다. 투여용량은 중증도의 영향을 일으킬 수 있는 정도의 용량으로 한다. 양성대조물질의 예는 표 1에 수록되어 있다.

표 1. 양성대조물질의 예와 특징 및 표적 조직

물질명과 CAS 번호	특징	돌연변이 표적 조직 또는 세포	
		랫드	마우스
N-Ethyl-N-nitrosourea [CAS no. 759-73-9]	직접 작용 돌연변이원	간, 폐	골수, 결장, 소장, 간, 폐, 비장, 신장, 난소 과립층 세포, 수컷의 생식세포
Ethyl carbamate (urethane) [CAS no. 51-79-6]	돌연변이원, 대사 필요, 약한 효과		골수, 전위, 소장, 간, 폐, 비장
2,4-Diaminotoluene [CAS no. 95-80-7]	돌연변이원, 대사 필요, Spi ⁻ 분석에서 양성반응	간	간
Benzo[a]pyrene [CAS no. 50-32-8]	돌연변이원, 대사 필요	간, 장막	골수, 유방, 결장, 전위, 선위, 심장, 간, 폐, 수컷의 생식세포

3.3 시험물질의 투여

시험물질은 일반적으로 위장관 튜브 또는 적절한 삽관을 사용하여 위관투여법으로 투여하되, 예상되는 인체 노출 경로를 고려하여 음용수, 피하, 정맥 내, 국소, 흡입, 기관 내, 식이 또는 이식과 같은 다른 노출 경로가 사용될 수 있다. 용매의 투여 액량은 동물의 체중 100 g 당 1 mL를 넘지 않도록 하며, 용매가 수용액인 경우에는 100 g 당 2 mL까지 투여가능하다. 이보다 많은 양의 사용은 타당한 근거를 제시한다.

3.4 투여일정

돌연변이가 매 처리마다 축적됨을 전제로, 28 일 동안 매일 반복 투여한다. 이는 일반적으로 약한 돌연변이원에 의한 충분한 돌연변이의 축적과 천천히 증식하는 장기의 돌연변이 검출에 적합한 노출 시간을 제공하기 위해 필요하다. 시험물질 처리는 모든 관련 대사 효소의 완전한 유도에 필요한 시간보다 짧아서는 안 되며, 더 짧은 처리를 할 때는 다른 증식률을 가진 장기들에 적합한 여러 번의 샘플링이 필요할 수도 있다. 이러한 기준에서 벗어난 경우라면, 프로토콜을 결정할 때 모든 사용 가능한 정보(예를 들면, 일반적인 독성, 대사 및 약물동태학)를 고려한다. 8 주 이상의 투여기간을 이용하는 경우에는 민감도가 증가할 수 있지만, 시험물질의 투여기간이 오래 걸리면 클론확장을 통해 돌연변이 빈도가

명백하게 증가할 수 있기 때문에 명확하고 확실한 설명이 필요하다.

3.5 관찰사항

동물의 건강에 관련된 일반적인 임상증상관찰은 하루에 적어도 1 회, 투여 후 예상되는 반응최대시간을 고려하여, 가능하면 매일 같은 시간에 시행하고 기록한다. 투여기간 동안 최소 하루에 2 회 이환율과 사망률을 조사한다. 각 개체 모두에 대해 적어도 일주일에 한 번 이상, 그리고 시험기간의 종료 시에 체중을 측정한다. 사료 섭취량은 사료를 교환할 때마다, 그리고 적어도 주 1 회 이상 측정한다. 시험물질을 음용수에 섞어 투여하는 경우, 음용수 섭취량은 음용수를 교환할 때마다, 그리고 적어도 주 1 회 이상 측정한다.

3.6 시료채취

3.6.1 체세포

시료채취 시기는 돌연변이가 고정되는 데에 필요한 기간에 따라 결정되기 때문에 중요한 변수이며, 조직 특이적인 주기(turnover time)와 관련될 수 있다. 예를 들어, 골수나 장은 빠르고 간은 훨씬 느리다. 빠르게 증식하는 조직과 천천히 증식하는 조직 모두에서 돌연변이 빈도를 측정하기에 적절한 절충안으로 28 일 연속 시험물질을 처리하고, 마지막 처리 3 일 후(28 + 3 일) 시료를 채취한다. 천천히 증식하는 조직에서는 이 조건 하에서 최대 돌연변이 빈도가 나타나지 않을 수도 있으므로, 필요하다면 천천히 증식하는 조직에 대해서는 28 일 투여 기간 이후 다시 28 일 이후(28 + 28 일)에 시료를 채취할 수도 있다.

3.6.2 생식세포

(1) TGR 분석은 정자 형성의 시기와 동력학 거동이 잘 정의되어 있는 수컷 생식세포 유전자 돌연변이 유발 연구에 적합하지만, 암컷 생식세포 유전자 돌연변이 연구에는 적합하지 않을 수 있다. 이는 과잉 배란 후에도 적은 수의 난자만이 분석 가능하고 난모세포에 DNA 합성이 없기 때문이다.

(2) 수컷 생식세포의 시료채취 시기를 적절하게 선택한다. 생식세포가 정원줄기 세포로부터 부고환 꼬리부에 도달한 성숙한 정자에 이르기까지 발달 진행시간은 마우스의 경우 ~ 49 일, 랫드의 경우 ~ 70 일이다. 그러므로 28 일간 시험물질을 처리하고 난 후 3 일 후(28 + 3 일) 부고환 꼬리부에서 채취한 정자는 시험물질의

영향을 충분히 받지 않은 것일 수 있다. 따라서, 시험물질을 투여하고 난 후 28 일 이후(28 + 28 일)에 생식세포를 취하는 것이 바람직하다.

3.7 조직수집 및 돌연변이 분석대상 조직선택

- (1) 채취하는 조직의 선택은 시험을 수행하는 이유와 조사 중인 시험물질의 돌연변이원성, 발암성 또는 독성에 대한 기존 시험자료를 기반으로 한다. 노출 경로 및 예상 조직 분포, 가능한 작용 기전 등을 고려하여 조직수집 대상을 결정한다. 조직수집 대상 조직은 빠르게 증식하거나, 천천히 증식하거나, 화학물질에 노출된 조직의 부위를 대표하는 조직이어야 한다. 또한 향후 생식세포 돌연변이원성 분석이 필요한 경우, 부고환 꼬리부로부터 생식세포를 수집하여 보관한다. 장기의 무게를 측정하도록 하며, 큰 장기의 경우, 모든 동물에서 같은 부위를 수집해야 한다.
- (2) 조직(혹은 조직 파쇄액)은 -70 °C 또는 그 이하에서 보관하며 5 년 이내에 DNA 분리에 사용해야 한다. 적절한 완충액에 4 °C에서 냉장 보관된 분리 DNA는 1 년 이내에 돌연변이 분석에 적절하게 사용해야 한다.
- (3) 수집된 조직 중에서, 투여 경로 및 표적장기 등을 고려하여 돌연변이 분석을 위한 조직을 선택한다.
- (4) 일반적으로, 간 그리고 세포분열이 활발한 조직(예를 들면, 선위, 골수) 중 하나 또는 그 이상에 대해 돌연변이원성을 평가한다. 체세포 양성반응을 포함하여 생식세포에 대한 유전독성 자료 제출이 필요한 경우, 생식세포에 대해서도 평가한다.

3.8 측정방법

lacZ 박테리오파지 마우스(Muta™Mouse) 및 lacZ 플라스미드 마우스, gpt 델타 마우스 및 랫드(gpt 및 Spi⁻), lacI 마우스 및 랫드(Big Blue®), cII 분석 등에서의 형질전환 유전자의 돌연변이는 사용되는 형질전환 설치류의 종류에 따라 기존 문헌에서 공개된 각각의 표준 시험법에 따라 수행한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험결과의 처리

- (1) 실험의 단위가 동물이므로 개체 동물마다 시험자료와 요약한 결과 모두를 표 형식으로 제시한다. 보고서에는 각 동물의 각 조직에 대한 플라크형성단위

(pfu) 또는 집락형성단위(cfu)의 총 수, 돌연변이 수 및 돌연변이 빈도를 포함한다.

(2) 독성 및 임상 징후에 대한 결과를 보고한다.

(3) 각 돌연변이체에 대해 염기서열이 분석되었다면 그 결과를 포함하여 제시하며, 결과적으로 각 동물 및 조직에 대한 돌연변이 빈도 계산 결과를 제시한다.

(4) 용제/용매 대조군에 비하여 돌연변이 빈도가 용량에 따라 증가하든가 또는 하나의 용량 그룹에서 돌연변이 빈도가 명확히 증가하는 경우 등은 양성결과로 간주될 수 있다. 용량-반응 분석을 위한 충분한 자료를 제공하기 위해서는 적어도 3 개의 용량처리군을 분석해야 한다. 결과의 생물학적 관련성이 우선 고려되어야 하지만, 적절한 통계를 이용하여 시험 결과를 분석할 수 있으며, 통계분석에서는 동물을 실험단위로 간주한다. 어떠한 조직에서도 위의 양성결과 기준을 충족시키지 못하는 시험물질은 이 시험에서 돌연변이원이 아닌 것으로 간주된다. 음성 결과의 생물학적 관련성을 위해 조직 노출을 확인한다.

2. 시험결과의 보고

시험결과의 보고는 다음 정보를 포함한다.

2.1 시험물질

2.1.1 물질데이터(CAS 번호, 출처, 순도, 로트 번호 등)

2.1.2 물리·화학적 특성(휘발성, 안정성, 용해도 등)

2.2 용매(부형제)

2.2.1 용매의 출처, 순도

2.2.2 용매선정의 논리적 근거

2.3 실험동물

2.3.1 사용된 종/계통 및 선택의 타당성

2.3.2 시험시작 시의 군 당 체중범위, 평균, 표준편차를 포함한 각 개체의 체중

2.3.3 동물의 수와 주령

2.3.4 동물의 구매처와 사육조건, 사료 등

2.4 시험조건

2.4.1 시험물질 조제와 투여에 관한 세부사항

2.4.2 용량선정의 논리적 근거

2.4.3 용매와 시험물질의 사용농도와 적용된 시험물질의 총 양

2.4.4 사료와 음용수의 세부사항

2.4.5 처리 및 시료채취 일정에 대한 자세한 설명과 선택에 대한 타당성

2.4.6 독성 측정방법

2.4.7 양성 또는 음성에 관한 판정기준

2.4.8 음성 결과가 얻어진 경우, 시험물질이 표적조직이나 전신순환에 도달한 것을 확인하는 방법

2.4.9 조직의 분리 및 저장방법

2.4.10 설치류의 유전체 DNA를 분리하고, 유전체 DNA로부터 형질전환 유전자를 회수하고, 형질전환 DNA를 박테리아 숙주로 전달시키는 방법

2.4.11 모든 세포, 키트 및 시약의 원료 및 로트 번호(적용 가능한 경우)

2.4.12 돌연변이의체 계수 방법

2.4.13 해당되는 경우 돌연변이의 분자 분석 및 클론형성능(clonality) 보정 및/또는 돌연변이 빈도 계산에 사용되는 방법

2.5 결과

2.5.1 독성 징후를 포함하여 실험기간 전 및 실험기간 동안의 동물 상태

2.5.2 치사 시 체중과 장기의 무게

2.5.3 각 조직/동물에 대한 돌연변이체 수, 평가된 플라크 또는 집락 수, 돌연변이체 빈도

2.5.4 각 조직/동물 군, DNA 시료 당 패키징 반응의 횟수, 돌연변이체의 전체 수, 평균 돌연변이 빈도, 표준편차

2.5.5 가능한 경우, 용량-반응 상관관계

2.5.6 돌연변이의 분자 분석을 수행한 경우, 조직/동물에 대한 독립적 돌연변이체 및 평균 돌연변이 횟수

2.5.7 범위, 평균 및 표준편차를 수반하는 동시 및 과거의 음성대조군 시험자료

2.5.8 동시 양성대조군(또는 비-동시 DNA 양성대조군) 자료

2.5.9 가능한 경우, 분석적 결정(예를 들면, 패키징에 사용된 DNA 농도, DNA 염기 서열분석 자료)

2.5.10 통계 분석 방법

2.6 결과의 토의

2.7 결론

제59항 급성 흡입독성시험(고정농도법)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 실험동물이 흡입할 수 있는 물질(가스, 증기, 에어로졸)을 단기간 노출시켰을 때 나타나는 건강장애를 평가하는 데 그 목적이 있다. 부식성 또는 심한 자극성으로 인해 실험동물이 심각한 통증과 고통을 느낄 것으로 예상되는 농도 및 치사량 이상의 농도에 대해서는 가급적 시험하지 않도록 하며, 치사량 이하의 농도를 설정하여 시험한다. 이 시험으로 얻은 결과는 시험물질의 분류와 표시에 관한 정보를 제공한다.

2. 용어 정의

2.1 급성 흡입독성

흡입 가능한 물질을 단기간(24 시간 이내)에 1 회 흡입 노출시켰을 때 시험물질에 의해 나타나는 악영향

II. 시험

1. 고려사항

시험을 수행하기 전에 시험물질에 관한 정보(예, 생체외 시험결과, 생체내 시험결과, 구조-활성 상관성, 물리화학적 성질 등)를 수집하여 평가한 후 급성 흡입독성에 관한 독성 정보가 충분하다고 판단되면 더 이상의 동물실험은 수행하지 않도록 한다.

2. 시험의 준비

2.1 장치

2.1.1 전신노출

최소한 19 %의 산소농도와 1 %를 초과하지 않는 이산화탄소 농도를 유지하는 것과, 시험물질의 분산농도가 균일하게 유지되는 노출환경을 유지하는 것이 가능하고 아울러 시간당 12 회 ~ 15 회의 환기가 유지되도록 고안된 흡입장치(챔버)를 사용한다. 챔버 안을 약간 음압으로 유지시켜 시험물질이 챔버 밖으로 누

출되지 않도록 한다. 챔버 내 환경의 안정성을 확실하게 유지하기 위해 사용동물의 총 용적을 챔버 용적의 5 % 이내로 하는 것이 좋다.

2.1.2 두부/비부 노출

최소한 19 %의 산소 농도 및 1 %를 초과하지 않는 이산화탄소 농도를 유지하여야 하며 시험물질 모니터링을 위해 시험공기를 채취하는 동안 공기흐름이 방해받지 않아야 한다. 동물의 호흡 환기량에 비해 최소 2 배를 초과하는 공기흐름이 유지되는 장치를 사용하여야 한다. 흡입장치에서 발생하는 고열로 인해 동물이 스트레스를 받는 일이 없어야 하며, 동물 고정에 필요한 장치에 의해 실험동물이 과도한 스트레스를 받지 않도록 하여야 한다.

2.1.3. 노출조건 및 모니터링

- (1) 개별 챔버에서의 시험물질 농도는 가스 및 증기의 경우에는 $\pm 10\%$ 이상을 벗어나지 않아야 하며, 액체 또는 고체 에어로졸의 경우에는 $\pm 20\%$ 이상을 벗어나지 않아야 한다. 폭발의 위험성이 있는 시료는 노출조건에 주의한다.
- (2) 에어로졸이 호흡기계에 광범위하게 노출되도록 하기 위해 공기역학중량평균지름(MMAD, mass median aerodynamic diameter)이 $\leq 4\mu\text{m}$ 이고, 기하표준편차(GSD, geometric standard deviation)가 1.0에서 3.0 사이로 하는 것이 좋다. 위의 MMAD에서 벗어날 경우 그 사유 및 타당성을 설명하도록 한다.
- (3) 챔버의 기류, 공기온도 및 상대습도는 지속적으로 모니터링하고 각 노출시간 동안 최소 3 회 이상 기록한다. 온도는 $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ 범위 내를 유지하며 호흡 구역의 상대 습도는 30 % ~ 70 %의 범위를 유지하는 것이 이상적이지만, 어떤 특정한 상황에서 시험물질의 특성(예: 수성 제형을 시험할 때)으로 인해 불가능하거나 측정할 수 없을 때에는 예외가 인정된다.

2.2 실험동물

(1) 동물의 종

건강하고 성숙한 랫드를 시험에 사용하는 것이 가장 좋으며 실험실에서 사용하는 일반적인 계통을 선택한다. 8 주령 ~ 12 주령의 동물을 사용하는 것이 적절하며 노출 시작 전 최소 5 일 전에 해당 실험실에 순화시킨다. 시험에 사용하는 동물 개체간 또는 각 시험군간의 체중 변동은 평균체중의 $\pm 20\%$ 를 초과하지 않아야 한다.

(2) 동물의 수 및 성별

감수성의 차이가 없다면 일반적으로 수컷을 사용하며 암컷이 수컷보다 더 민감하다는 정보가 있을 경우에는 암컷을 사용한다. 암컷은 임신이나 출산의 경험이 없어야 한다. 암수 중 한쪽 성별만 시험에 사용하며 예비시험 후 본시험에서는 각 시험농도마다 총 5 마리를 사용한다.

(3) 사육 및 급이조건

동물실의 온도는 $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 를, 상대습도는 30 % ~ 70 %를 반드시 유지시킨다. 인공조명은 매 12 시간 간격으로 점멸한다. 사료는 일반적으로 널리 쓰이는 것을 사용하며, 음용수는 자유롭게 섭취할 수 있도록 한다. 케이지 당 동물 수는 개개의 동물을 충분하게 관찰할 수 있는 범위로 한다.

2.3 시험조건

(1) 노출시간 및 농도

노출시간은 하루 4 시간을 권장한다. 명목농도는 일정시간 동안 챔버/튜브에 공급된 시험물질의 양을 동일시간에 공급된 총 공기량으로 나누어 계산한다. 노출기간 중 시험물질의 농도는 일정하여야 하며 분석방법에 따라 지속적으로 또는 간헐적으로 모니터링 한다. 간헐적으로 모니터링 할 경우에는 한 시간 간격으로 하며 이것이 가능하지 않은 경우에는 전체 노출기간 중 최소 1 회 이상의 시료를 채취하여 농도 분석을 실시한다.

(2) 입자의 크기분포

에어로졸 입자의 크기분포는 각 4 시간의 노출기간 동안 적어도 두 번 이상 측정한다. 크기분포는 공기역학중량평균지름(MMAD) 또는 기하평균직경(GMD, geometric mean diameter)으로 나타내며 GMD 측정은 SMPS(scanning mobility particle sizer)를 사용할 수 있다.

(3) 한계시험

기존의 독성시험결과 또는 구조-활성 상관성 또는 문헌 정보 등을 통해 시험물질의 흡입독성이 없는 것으로 판단되거나 규제제한농도 이상에서만 독성을 나타낼 것으로 판단되는 경우에는 한계시험을 실시한다. 가스의 경우 20,000 ppm, 증기의 경우 20 mg/L, 에어로졸의 경우 5 mg/L 농도로 본시험에서 5 마리 동물에 대해 시험을 수행하였을 때는 이를 한계시험으로 간주한다. GHS 카테고리 5에 해당하는 시험물질의 경우 시험을 수행하지 않을 수도 있다.

3. 시험 방법

3.1 원리

- (1) 이 시험은 실험동물 복지 및 윤리에 근거하여 실험에 사용되는 동물의 수를 줄이기 위해 제정된 방법이며 시험물질을 고정농도에 노출시킨 후 그 결과에 따라 다음 단계의 고정농도에 노출시키는 방식으로 진행한다. 시험물질의 종류에 따른 고정농도, 단계적 절차, 결과의 판단 등은 별표 1(예비시험)과 별표 2(본시험)에 제시되어 있다.
- (2) 이 시험은 사망률에 근거한 독성지표를 사용하기 보다는 일반증상관찰에서 나타나는 결과에 따른 GHS 카테고리 시험물질의 등급을 평가하며, 시험물질의 부식성 또는 심한 자극성으로 인해 실험동물이 통증과 극심한 고통을 느낄 것으로 예상되는 농도는 시험하지 않도록 한다.

3.2 예비시험

3.2.1 목적

예비시험의 목적은 가장 민감한 성별과 본시험에서의 시작 농도를 선정하는 데 필요한 정보를 얻는 데 있다. 만약 이에 관한 사전 정보가 있을 경우 예비시험은 수행하지 않아도 된다. 예비시험에서 명백한 독성의 징후를 보이거나 또는 사망/빈사상태가 보이는 최소 농도를 본시험의 시작농도로 한다.

3.2.2 동물의 수 및 성별

암컷 1 마리와 수컷 1 마리에 시험물질을 최소 4 시간 동안 노출하고 별표 1의 흐름도에 따라 순차적인 방식으로 시험을 진행한다. 어떤 농도에서든지 성별 차이가 나타나면, 본시험에서는 더 민감한 것으로 보이는 성별을 사용하여 수행한다. 성별 간의 민감도 차이가 뚜렷하지 않으면 본시험에서는 수컷을 사용한다.

3.2.3 시작농도

예비시험의 시작 농도는 별표 1에 나타난 고정농도 가운데 하나를 선택하는데, 이때의 농도는 기존의 독성 자료를 바탕으로 명백한 독성을 나타낼 것으로 예상되는 농도이다. 이러한 정보가 없을 경우에는 예비시험의 시작농도는 증기, 에어로졸 및 가스에 대해 각각 10 mg/L, 1 mg/L 또는 2,500 ppm로 한다.

3.2.4 일반증상관찰

각 동물에 대한 노출간격은 최소 24 시간이어야 한다. 일반적으로 시험한 모든 동물은 적어도 일주일 동안 관찰하여야 한다.

3.2.5 결과

본시험에 사용할 시작농도 및 GHS 카테고리 등급 분류는 별표 1에 따라 진행한다.

3.3 본시험

3.3.1 동물의 수 및 성별

예비시험을 바탕으로 암수 중 더 민감한 성별에 대해 각 시험농도마다 5 마리를 사용한다.

3.3.2 시작농도

별표 1의 흐름도에 따라 수행된 예비시험의 결과를 바탕으로 선정한다.

3.3.3 단계별 시험

시작농도에 대한 시험 후 다음 단계의 진행사항은 별표 2에 제시되어 있다. 각 시험결과에 따라 해당 시험농도에서 시험을 중지하고 적절한 유해성 등급 분류를 지정하거나, 더 높은 고정농도에서 시험하거나, 또는 더 낮은 고정농도에서 시험한다. 어떤 농도에서 동물이 2 마리 ~ 3 마리 사망하게 되면 시험은 그 단계에서 중단한다. 각 농도에서 노출 간격은 독성 징후의 발병, 지속 기간 및 중증도에 의해 결정된다. 이전에 노출한 동물의 생존을 확인할 때까지 다음 농도의 시험물질은 노출시키지 않아야 한다. 지연성 독성을 관찰할 수 있도록 각 농도 수준에서 투여의 시간 간격은 3 일 또는 4 일의 기간이 권장되며 반응의 정도에 따라 적절하게 조정할 수 있다(예, 결론을 내릴 수 없는 반응의 경우).

3.3.4 결과

GHS 카테고리 등급 분류는 별표 2에 따라 진행한다.

3.4 일반증상관찰

- (1) 각 시험동물은 노출기간 동안 자주 관찰한다. 투여 당일에는 최소한 2 회 이상 관찰하며 동물의 일반증상이 나타날 경우에는 더 자주 주의 깊게 관찰한다.

- (2) 그 이후 총 14 일 동안 적어도 매일 1 회 관찰하여야 한다. 관찰 기간은 고정되어 있지 않지만 일반증상의 시작 시점과 상태, 회복 기간의 정도를 바탕으로 결정한다. 독성의 징후가 나타나고 사라지는 시기는 중요하며 특히 독성 징후의 시작 시점이 지연되어 발생하는 경우가 있으므로 주의한다.
- (3) 모든 관찰은 체계적으로 기록하며 각 동물의 개체마다 기록한다. 빈사상태의 동물과 심각한 통증이나 극심한 고통을 지속적으로 보이는 동물은 인도적으로 처사시킨다. 안락사를 시킬 필요가 있는 동물은 사망개체로 간주한다.
- (4) 피부와 털, 눈과 점막, 호흡기, 순환기, 자율 신경계, 중추 신경계, 전신 운동 활동 및 행동 패턴의 변화를 관찰하며, 국소 영향과 전신 영향을 구분한다. 떨림, 경련, 타액 분비, 설사, 무기력, 불규칙 호흡, 수면, 혼수상태 및 체중 감소 등을 주의 깊게 관찰한다.

3.5 체중

- (1) 개별 동물의 체중은 순화기간에 최소 1 회 이상 측정하며 노출을 시작하는 날(0 일)에는 노출 직전에 측정한다. 노출 후 1 일, 3 일, 7 일 그리고 그 이후에는 매주 마다 측정한다. 사망하거나 안락사 시킨 경우에도 체중을 측정한다.
- (2) 체중은 독성의 중요한 지표이다. 노출을 시작한 당일에 비해 체중이 10 % 이상 감소하는 동물은 명백한 독성이 나타나고 있다는 것을 의미한다. 동물의 상태에 대한 우려가 있는 경우 더 자주 체중을 측정한다. 관찰기간 종료 후, 생존 동물에 대해서는 체중을 측정하고 안락사 시킨다.

3.6 병리검사

시험 중에 사망하거나 안락사 시킨 경우를 포함하여 모든 동물에 대해서는 일반부검을 실시한다. 노출 후 24 시간 이상 생존한 동물에서 일반부검결과 이상 소견이 발생한 동물의 기관에 대해서는 조직병리학적 검사를 고려할 필요가 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

시험결과는 각 동물 개체별로 제시한다. 각 시험군 별로 사용된 동물의 수, 독성의 징후를 나타내는 동물의 수, 시험 중 사망하거나 안락사 시킨 동물의 수, 개별 동물의 사망 시간(정확한 시간이 알려지지 않은 경우 대략적인 사망 시간), 독성 영향과 가역성의 발현경과, 부검결과 등을 표 형태로 요약하여 제시한다.

2. 시험결과의 보고

시험 보고서는 다음 항목을 포함한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 실험동물

- (1) 사육조건
- (2) 랫드가 아닌 종을 사용할 경우 사용한 동물의 종/계통과 근거
- (3) 동물의 수, 주령, 성별(암컷 사용 시 근거자료)
- (4) 각 시험군에 대한 동물의 배당 방법
- (5) 사료와 음용수에 대한 세부사항
- (6) 시험 시작 전 동물의 상태

2.4 시험물질

- (1) 물리적 기원, 순도, 물리화학적 성질(안정성, 용해도, pH, 삼투압, 침전물 여부 등)
- (2) 식별정보 및 CAS 번호

2.5 시험용매

- (1) 용매 사용과 선정의 근거(물을 사용한 경우는 불필요)
- (2) 용매가 연구 결과를 방해하지 않음을 입증하는 과거 혹은 현재의 자료

2.6 시험조건

- (1) 시험물질 조제 관련사항(분말의 입자 크기를 줄이거나 시험물질의 용액을 조제하기 위해 사용된 절차의 세부 사항 포함)
- (2) 시험공기 생성 및 동물의 시험공기 노출에 사용한 장비
- (3) 챔버 온도, 습도 및 기류의 모니터링 장비
- (4) 챔버 농도 및 입자 크기분포 측정을 위한 장비
- (5) 화학적 분석 및 검증 방법(회수율 포함)
- (6) 노출 농도의 평형에 필요한 시간

(7) 시작 농도의 선택에 대한 이론적 근거

2.7 결과

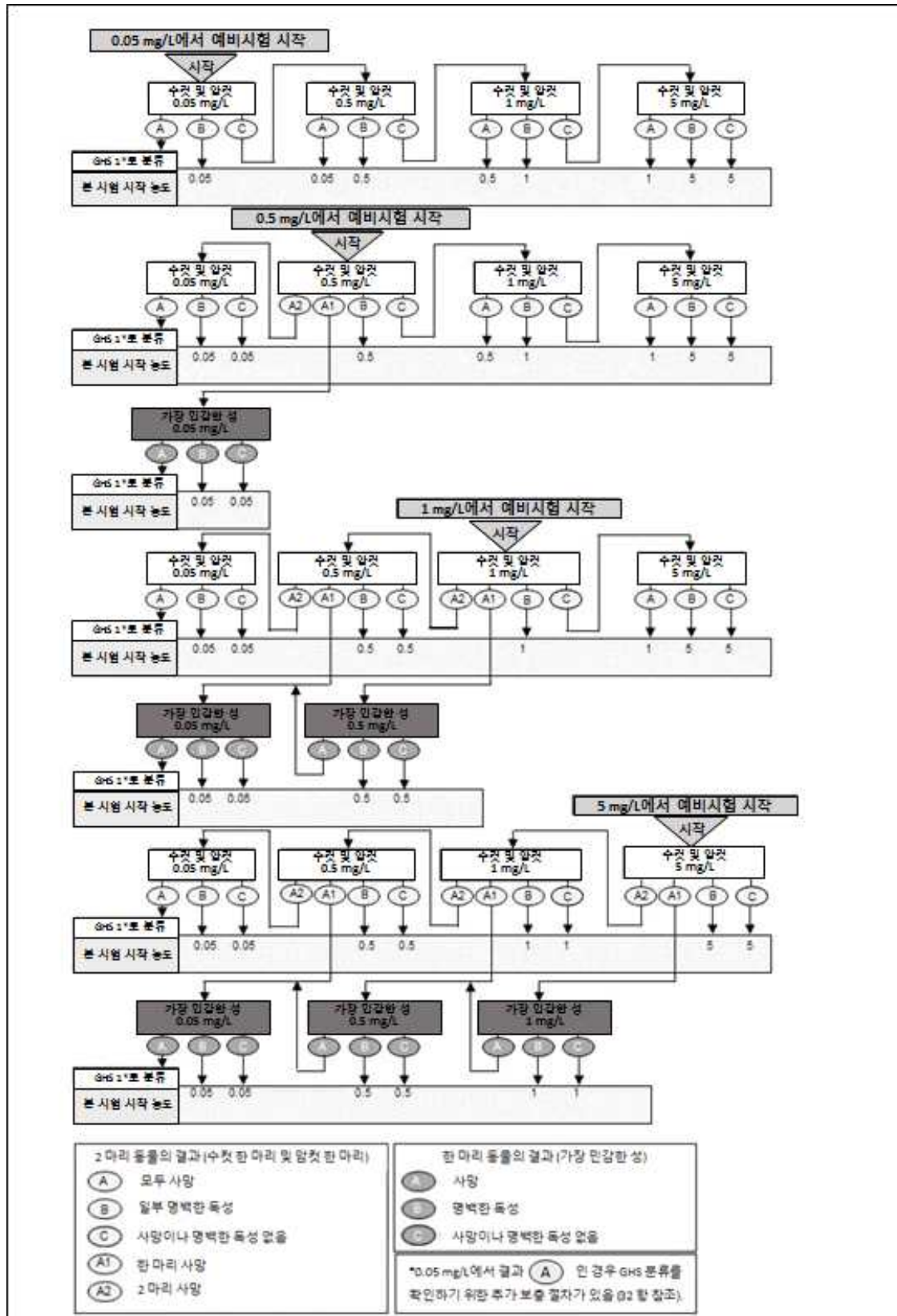
- (1) 챔버 온도, 습도 및 공기 유량의 자료(도표화)
- (2) 챔버의 명목농도, 분석농도 자료(도표화)
- (3) 분석 시료 수집 자료, 입자 크기 분포 및 MMAD 및 GSD의 계산을 포함한 입자 크기 자료(도표화)
- (4) 각 동물에 대한 반응 자료 및 농도 수준(도표화)
- (5) 동물의 개체별 체중
- (6) 예정된 안락사 이전에 사망한 날짜 및 시간, 독성 징후의 시작 시간 및 가역성
- (7) 각 동물에 대한 부검 결과, 조직병리학적 소견

2.8 결과에 대한 토론 및 해석

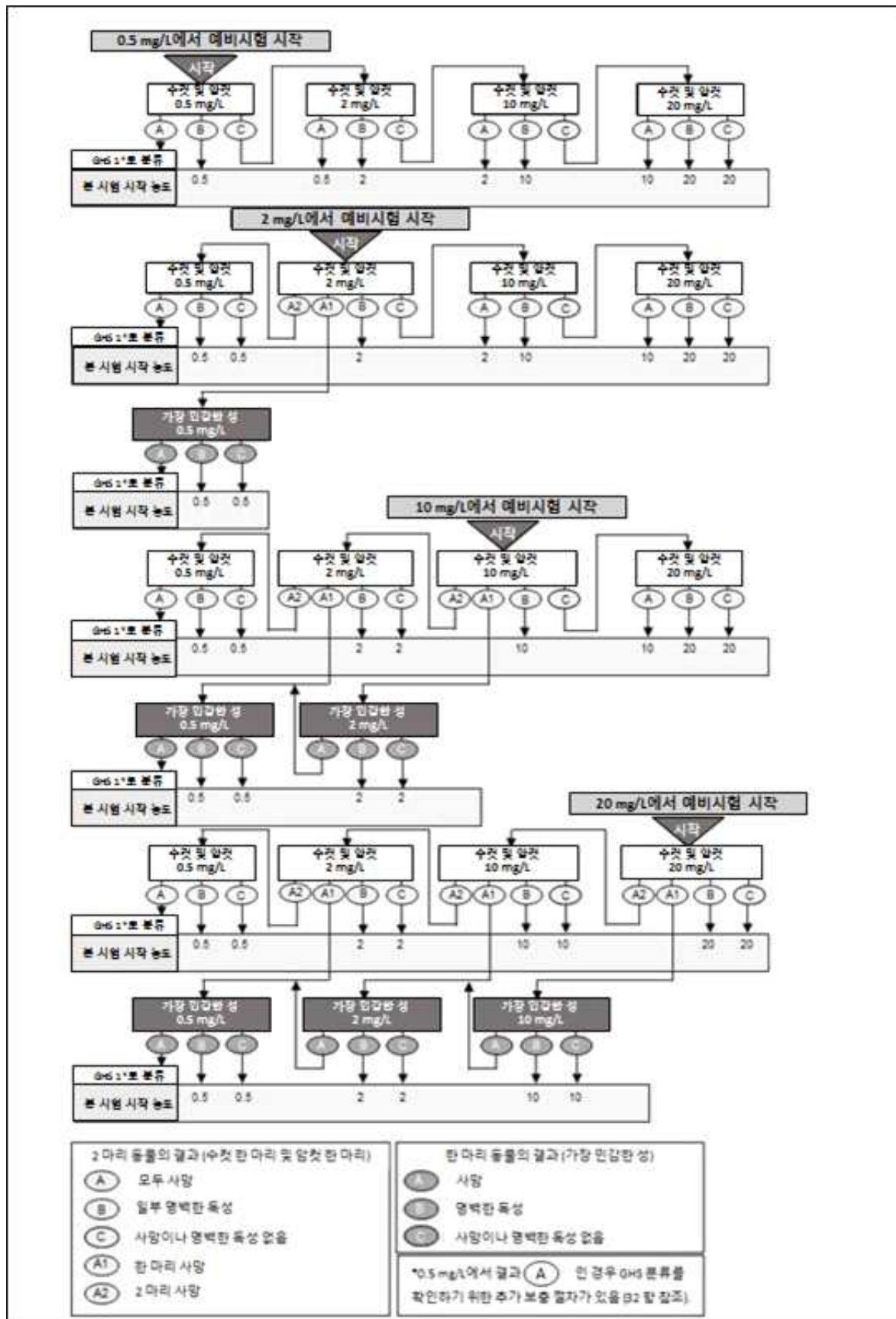
2.9 결론

별표 1

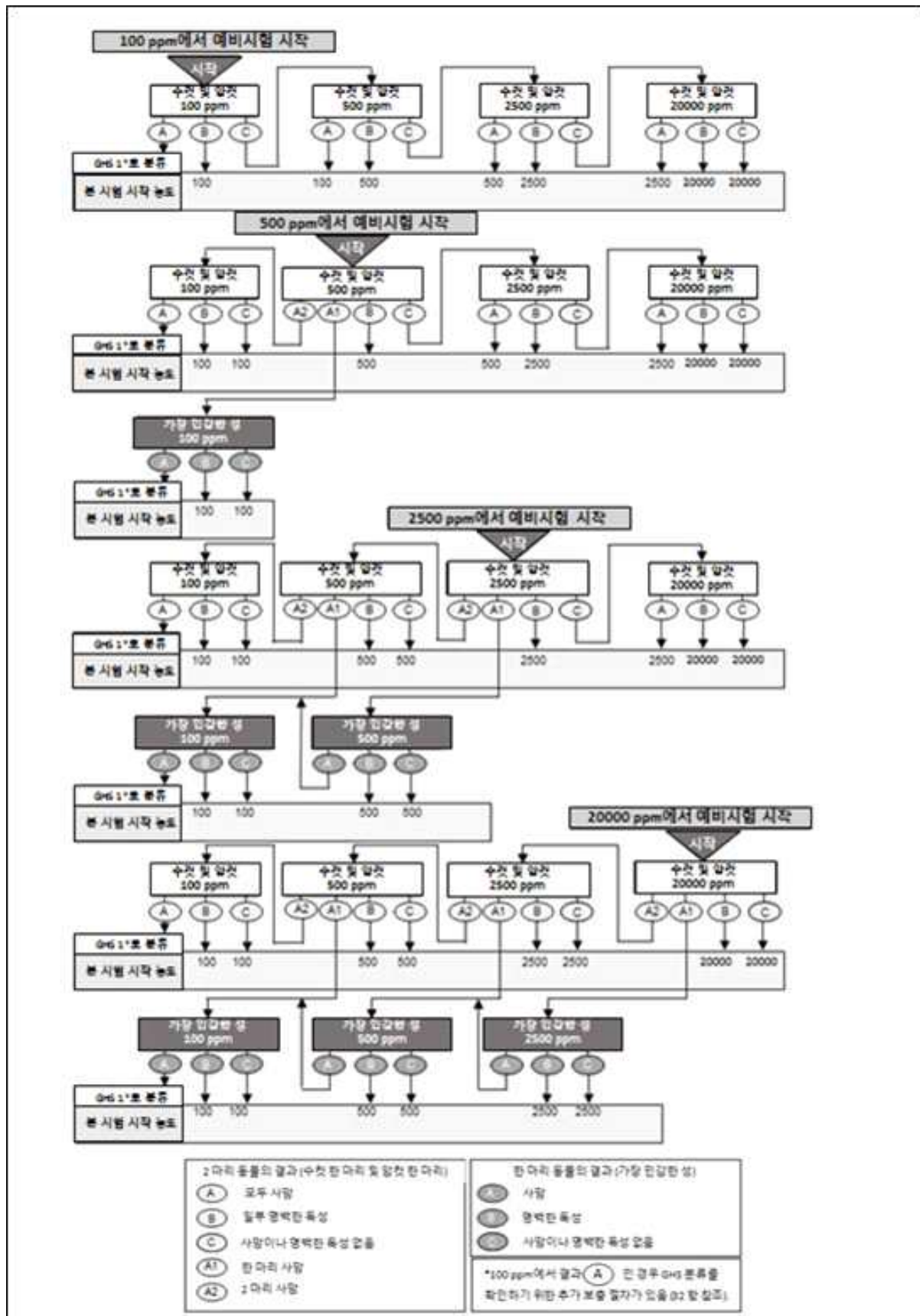
1. 예비시험을 위한 흐름도 - 에어로졸



2. 예비시험을 위한 흐름도 - 증기

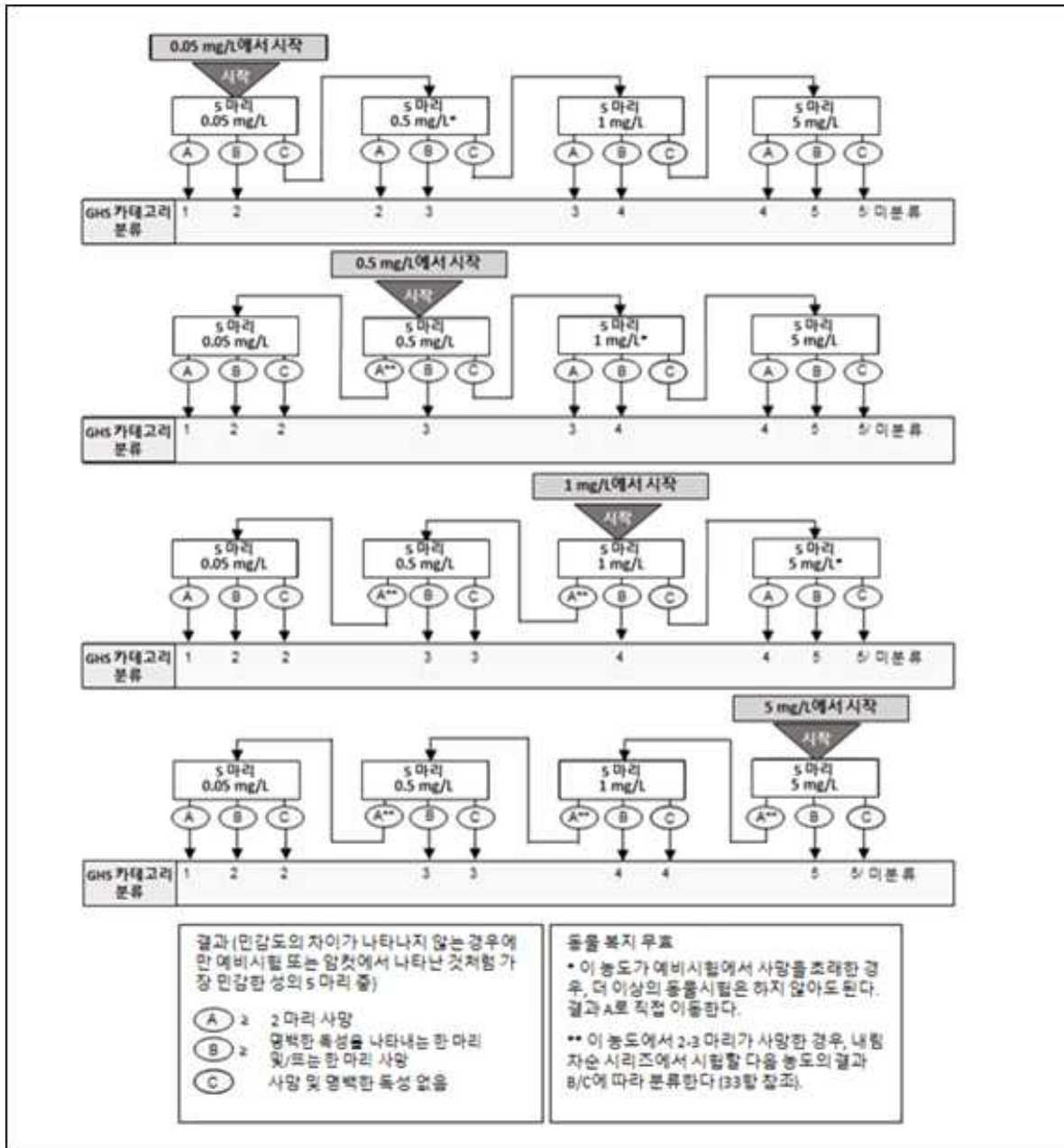


3. 예비시험을 위한 흐름도 - 가스

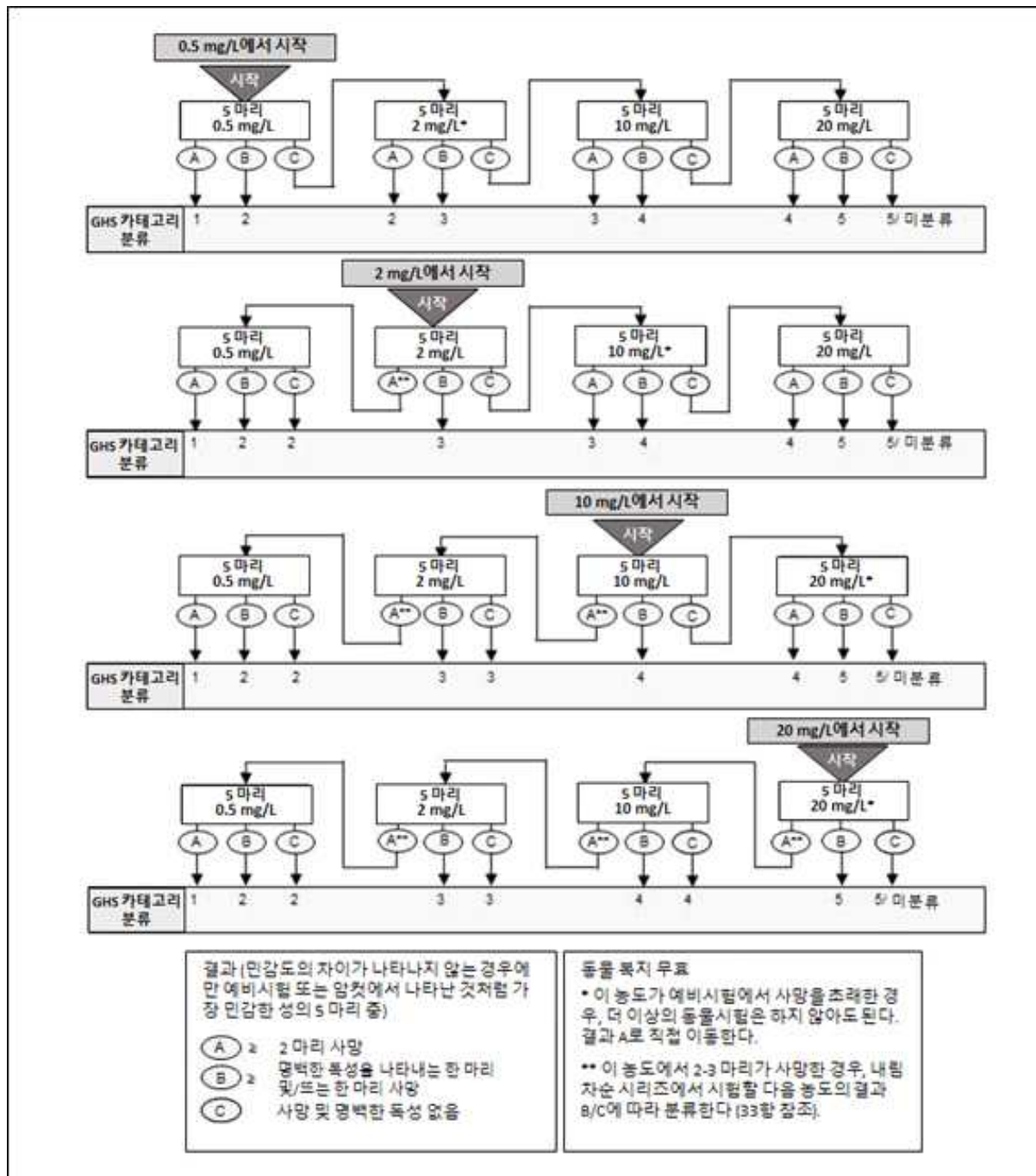


별표 2

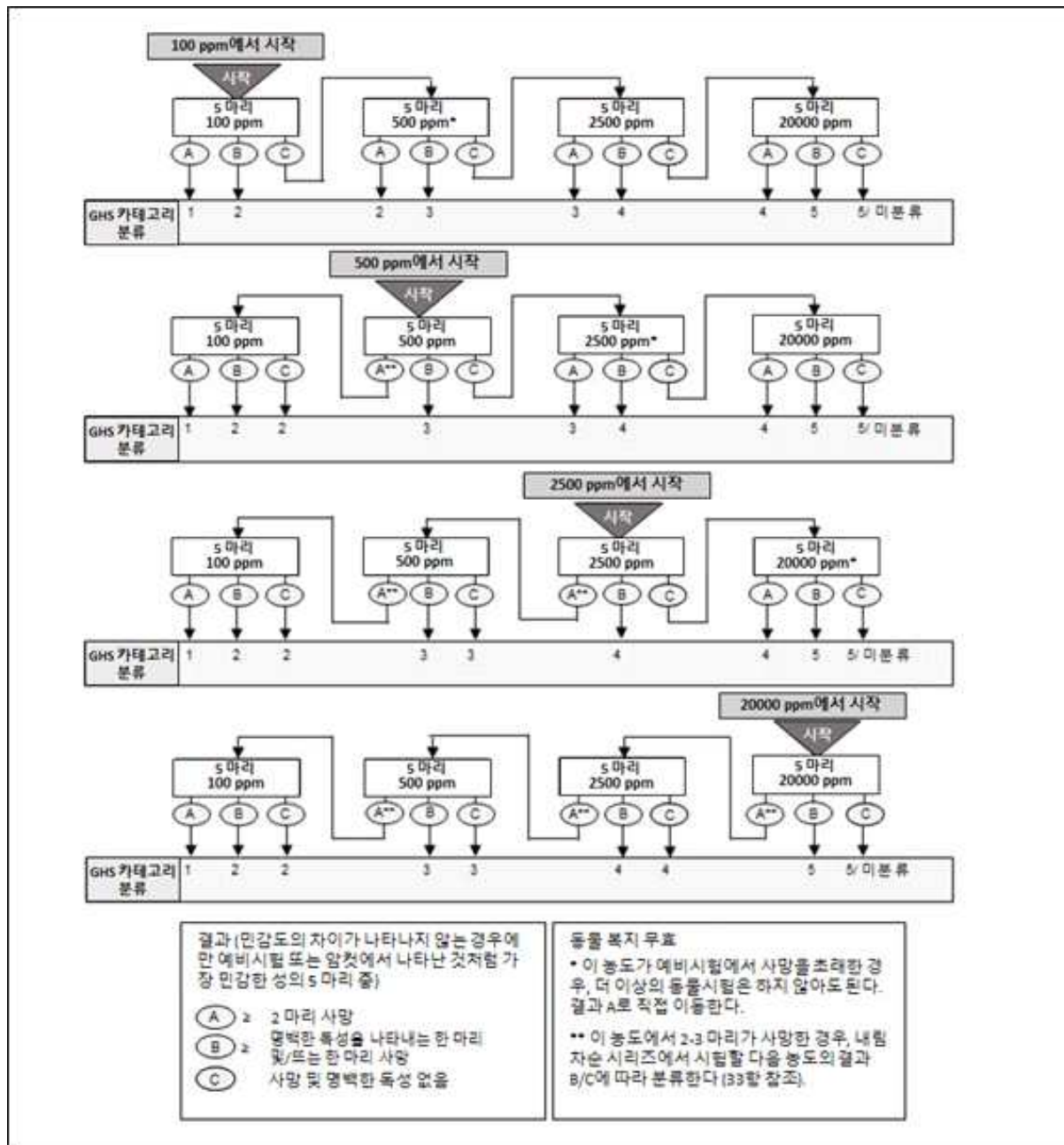
1. 본시험을 위한 흐름도 - 에어로졸



2. 본시험을 위한 흐름도 - 증기



3. 본시험을 위한 흐름도 - 가스



제60항 생체의 피부과민성시험

가. 인체세포주 활성화 시험, h-CLAT

I. 개요

1. 목적

이 시험은 THP-1 세포주에서의 단핵세포 및 수지상 세포의 활성화 과정과 관련된 세포 표면 지표(CD86 및 CD54)를 측정함으로써 피부과민성 물질과 비과민성 물질을 판정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 피부과민성

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2 CV75

세포 생존율 75 %를 나타내는 추정 농도

2.3 EC150

CD86 발현에서 RFI값이 150을 나타내는 농도

2.4 EC200

CD54 발현에서 RFI값이 200을 나타내는 농도

2.5 상대 형광 강도(RFI, relative fluorescence intensity)

용매 대조군 세포에서의 기하평균 형광강도(MFI, geometric mean fluorescence intensity)와 비교하여 시험물질 처리군 세포에서의 기하평균 형광강도(MFI)의 상대 값

II. 시험

1. 고려사항

- (1) h-CLAT 방법은 다양한 시험물질에 적용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 그러나, Log Kow가 3.5 이상인 시험물질은 위음성 결과를 산출하는 경향이 있다. 따라서, Log Kow가 3.5 이상인 시험물질에 대한 음성결과는 고려하지 않아야 한다. 또한, 시험에 사용하는 세포주의 대사능력이 충분하지 않아 대사효소를 통한 효소적 활성화가 필요한 물질은 경우에 따라 음성 결과를 나타낼 수도 있으므로 음성 결과를 해석할 때는 주의가 필요하다.
- (2) 화학물질의 과민성을 분류하는 데 있어서는 이 시험방법에 의한 결과만을 단독으로 사용하는 것보다는 이 외의 다른 과민성 시험법의 결과를 같이 사용하여 판단하는 것이 좋다. 더구나, 국소림프절 시험(LLNA, local lymph node assay) 등 생체 내(*in vivo*) 시험결과 또한 사람에게 적용하는 데는 한계가 있다는 점을 감안할 때, 이 시험과 같이 생체 외(*in vitro*) 시험법을 사람에게 바로 적용하는 것은 한계가 있다.

2. 원리

인간 단핵구 백혈병 세포주인 THP-1 세포에 시험물질을 24 시간 노출시킨 후 THP-1 세포상의 세포표면지표(CD86 및 CD54)의 발현에 대한 변화를 정량한다. 표면지표 발현의 변화는 형광색소가 부착된 항체로 세포를 염색한 후 유세포분석법으로 측정한다. 시험물질을 처리하지 않은 용매 대조군과 비교한 표면지표의 상대적 형광강도를 계산하여 과민성 물질과 비과민성 물질을 구분한다.

3. 시험방법

3.1 세포주

- (1) THP-1 세포는 2 일 ~ 3 일 간격으로 0.1×10^6 세포/mL ~ 0.2×10^6 세포/mL의 밀도로 접종하며 0.1×10^6 세포/mL ~ 1.0×10^6 세포/mL의 밀도로 유지시킨다. 시험에 사용하기 전에 반응성 검사를 수행하며, 반응성 검사는 양성대조군으로 2,4-dinitrochlorobenzene(DNCB)과 nickel sulfate(NiSO₄)을 사용하고, 음성대조군으로 젖산(LA, lactic acid)을 사용하며 세포 해동 후 2 주 후에 수행한다. 반응성 검사를 통과한 세포만을 분석에 사용한다. 세포는 해동 후 최대 2 개월까지 증식시켜 사용할 수 있다. 계대 배양 횟수는 30 계대를 초과하지 않아야 한다.

- (2) THP-1 세포를 0.1×10^6 세포/mL 또는 0.2×10^6 세포/mL의 밀도로 접종하고, 배양 플라스크에서 각각 72 시간 또는 48 시간 동안 사전배양한다. 시험 당일, 배양 플라스크로부터 얻어진 세포를 2×10^6 세포/mL의 농도가 되도록 신선한 배양 배지로 재현탁시킨 후 500 μ L(1×10^6 세포/웰)씩 24 웰에 분주하거나 80 μ L(1.6×10^5 세포/웰)씩 96 웰에 분주한다.

3.2 농도설정 시험

용매대조군과 비교하여 75 % 세포 생존율(CV, cell viability)을 초래하는 시험물질 농도인 CV75를 결정하기 위해 농도설정시험을 수행한다. CV75 값은 CD86/CD54 발현 측정을 위한 시험물질의 농도를 결정하는 데 사용된다.

3.2.1 시험물질과 대조물질

- (1) 시험물질 및 대조물질은 시험 당일에 조제한다. 1 차 용매로 식염수나 배지를 사용하며, 1 차 용매에 녹지 않을 경우 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해 또는 분산시킨다. 각각 100 mg/mL(식염수 또는 배지 중) 또는 500 mg/mL(DMSO 중)의 농도로 조제한다. DMSO 외 다른 용제도 사용될 수 있으나 시험물질의 안정성을 고려하여야 한다.
- (2) 식염수 또는 배지를 사용하여 용해시킨 경우 100 mg/mL 농도를 2 배 연속 희석하여 8 개의 저장용액을 만들고 이를 배양 배지에 각각 50 배 희석시켜 사용한다(작업용액). 시험 플레이트에서의 최고농도로서 최종농도 1000 μ g/mL이 무독성인 경우, 새로운 세포독성 시험을 수행하여 최고농도를 다시 결정한다. 최종 농도는 5,000 μ g/mL를 초과해서는 안 된다.
- (3) DMSO를 용제로 하여 용해시킨 경우 500 mg/mL 농도를 2 배 연속 희석하여 8 개의 저장용액을 만들고 이를 배양배지에 각각 250 배 희석시켜 사용한다(작업용액). 플레이트의 최종 농도는 1,000 μ g/mL를 초과해서는 안 된다.
- (4) 플레이트의 THP-1 세포 현탁액에 동량의 작업용액을 첨가하여 추가로 2 배 희석시킨 농도가 최종적인 노출 농도에 해당한다(일반적으로 플레이트에서의 최종 농도 범위는 7.81 μ g/mL ~ 1,000 μ g/mL).

3.2.2 시험물질의 노출

각 농도로 제조된 작업용액을 24 웰 또는 96 웰 플레이트에 배양된 세포 현탁

액과 1:1(v/v)로 혼합한다. 처리된 플레이트를 37 °C, 5 % CO₂ 하에서 24 시간 ± 0.5 시간 동안 배양한다. 휘발성 시험물질의 증발과 시험물질에 의한 웰 간 교차 오염을 방지하기 위해 주의를 기울여야 하며, 이 경우 시험물질과 함께 배양하기 전에 플레이트를 밀봉하는 방법을 사용할 수 있다.

3.2.3 Propidium iodide(PI)염색

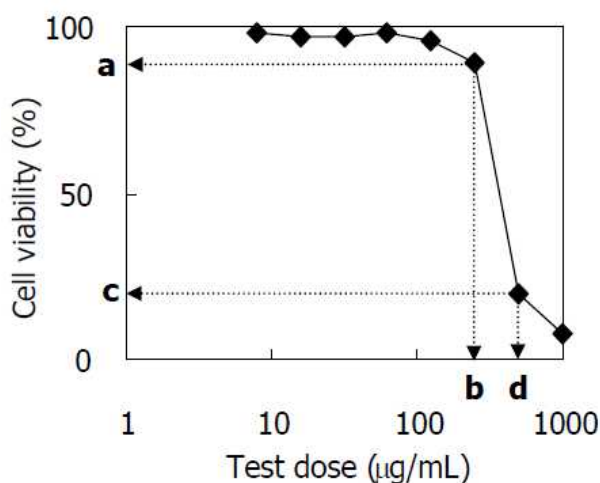
24 시간 ± 0.5 시간 동안 시험물질을 노출시킨 이후 세포를 회수하고 0.1 % FBS 함유 인산완충용액으로 세척한 후 재현탁시키고 최종농도 0.625 μg/mL가 되게 PI 용액을 첨가한다.

3.2.4 CV75 값 추정

세포독성의 지표로서 PI의 세포내 흡수는 유세포분석기를 사용하여 측정한다. 세포생존율은 총세포수에 대한 살아있는 세포수의 백분율로 표시한다. CV75 값, 즉 THP-1 세포 생존율의 75 %(25 % 세포독성)를 나타내는 농도를 다음 식을 이용하여 로그-선형 보간법(log-linear interpolation)으로 산출 한다.

$$\text{Log CV75} = \frac{(75 - c) \times \text{Log}(b) - (75 - a) \times \text{Log}(d)}{a - c}$$

이때 a는 75 % 이상의 세포 생존율의 최솟값, c는 75 % 미만의 세포 생존율의 최댓값, b 및 d는 각각 세포 생존율 a 및 c의 값을 나타내는 농도이다.



3.3 CD86/CD54 발현 측정

3.3.1 시험물질 및 대조물질의 조제

- (1) 시험물질을 식염수 또는 배지에 녹여 노출시키는 경우 $1.2 \times CV75$ 의 100 배, DMSO에 녹여 노출시키는 경우에는 $1.2 \times CV75$ 의 500 배에 해당하는 농도로 먼저 희석하고 이를 출발용액으로 한다. CV75를 측정할 수 없는 경우에는 시험물질의 최고 용해농도 또는 안정하게 분산된 농도를 시작 농도로 사용한다. 최종농도는 $5,000 \mu\text{g/mL}$ (식염수 또는 배지의 경우) 또는 $1,000 \mu\text{g/mL}$ (DMSO의 경우)를 초과하지 않아야 한다.
- (2) 각 출발용액을 해당 용매 및 용제를 사용하여 1.2 배 연속 희석하여 저장용액을 조제한다. 이때 식염수 또는 배지의 경우 저장용액 농도는 $(100 \times 1.2 \times CV75) \sim (100 \times 0.335 \times CV75)$ 범위에 존재하며, DMSO의 경우 $(500 \times 1.2 \times CV75) \sim (500 \times 0.335 \times CV75)$ 의 범위에 존재하도록 희석한다.

3.3.2 시험물질의 노출

- (1) 조제한 각 저장용액을 50 배(식염수 또는 배지의 경우) 또는 250 배(DMSO의 경우)로 배양 배지에 추가 희석하여 작업용액을 조제한다. 이렇게 희석된 작업용액과 세포현탁액을 1:1로 혼합하여 시험물질을 노출시킨다.
- (2) 양성 대조물질인 DNCB는 DMSO를 사용하여 저장용액을 조제하며 플레이트의 최종 단일농도(일반적으로 $4.0 \mu\text{g/mL}$)로 노출시킨다.
- (3) 처리된 플레이트를 37°C , 5 % CO_2 하에서 24 시간 \pm 0.5 시간 동안 배양한다. 휘발성 시험물질의 증발과 시험물질에 의한 각 웰 간의 교차 오염을 방지하기 위해 주의를 기울여야 하며, 이 경우 시험물질과 함께 배양하기 전에 플레이트를 밀봉할 수 도 있다.

3.3.3 세포염색 및 분석

- (1) 시험물질 노출 후 세포를 시료튜브로 옮기고 원심분리 방법으로 회수한 다음 염색 완충액 1 mL로 세척한다. 세척 후 차단용액(blocking solution) $600 \mu\text{L}$ 로 4°C 에서 15 분간 처리한 후 96-웰 둥근 바닥 플레이트 또는 마이크로 튜브(3 웰 또는 3 개 튜브)에 각각 세포를 $180 \mu\text{L}$ 씩 취해 분주한다.
- (2) 원심분리 후, 세포를 4°C 에서 30 분 동안 FITC-표지된 항-CD86, 항-CD54 또는 마우스 IgG1(동종형) 항체 $50 \mu\text{L}$ 로 염색한다. 항체의 희석비율은 사용한 항체공급처의 프로토콜에 따라 실험실 조건에 맞게 적절히 희석하여 사용한다.

- (3) 염색 후 150 μ L의 염색 완충액으로 2 회 이상 세척하고, 염색 완충액(예: 400 μ L)에 재현탁 시킨 후 PI 용액을 추가한다. CD86 및 CD54의 발현수준 및 세포 생존율은 유세포분석법을 사용하여 분석한다.

3.3.4 시험자료의 처리

- (1) 세포생존율은 아래의 방식에 따라 구한다.

$$\text{세포 생존율} = \frac{\text{살아있는 세포의 수}}{\text{총 획득된 세포의 수}} \times 100$$

- (2) CD86 및 CD54의 상대 형광 강도(RFI, relative fluorescence intensity)는 아래의 방식에 따라 구한다.

$$RFI = \frac{\text{화학물질 처리된 세포의 } MFI - \text{화학물질 처리된 동종형 대조군 세포의 } MFI}{\text{용매/용제 처리된 양성 대조군 세포의 } MFI - \text{용매/용제 처리된 동종형 대조군 세포의 } MFI} \times 100$$

3.4 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 본시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 10 종의 숙련도 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표 1에 제시된 결과와 일치하는지를 확인한다.

표 1. 생체 외 피부과민성시험(h-CLAT)에 대한 숙련도 시험물질 및 그 결과

숙련도 물질	CAS 번호	물리적 상태	생체 내 예측	μ g/mL에서 CV75 참조 범위	CD86에 대한 h-CLAT 결과(μ g/mL에서 EC150 참조 범위)	CD54에 대한 h-CLAT 결과(μ g/mL에서 EC200 참조 범위)
2,4-Dinitrochlorobenzene	97-00-7	고체	과민성물질 (극심함)	2 ~ 12	양성 (0.5 ~ 10)	양성 (0.5 ~ 15)
4-Phenylenediamine	106-50-3	고체	과민성물질 (강함)	5 ~ 95	양성 (< 40)	음성 (> 1.5)
Nickel sulfate	10101-97-0	고체	과민성물질 (중간정도)	30 ~ 500	양성 (< 100)	양성 (10 ~ 100)
2-Mercaptbenzothiazole	149-30-4	고체	과민성물질 (중간정도)	30 ~ 400	음성 (> 10)	양성 (10 ~ 140)
R(+)-Limonene	5989-27-5	액체	과민성물질 (약함)	> 20	음성 (> 5)	양성 (< 250)
Imidazolidinyl urea	39236-46-9	고체	과민성물질 (약함)	25 ~ 100	양성 (20 ~ 90)	양성 (20 ~ 75)
Isopropanol	67-63-0	액체	비과민성물질	> 5,000	음성 (> 5,000)	음성 (> 5,000)
Glycerol	56-81-5	액체	비과민성물질	> 5,000	음성 (> 5,000)	음성 (> 5,000)
Lactic acid	50-21-5	액체	비과민성물질	1,500 ~ 5,000	음성 (> 5,000)	음성 (> 5,000)
4-Aminobenzoic acid	150-13-0	고체	비과민성물질	> 1,000	음성 (> 1,000)	음성 (> 1,000)

III. 시험결과 및 보고

1. 시험의 성립조건

- h-CLAT 방법을 사용할 때 다음의 시험 성립조건을 만족하여야 한다.
- 배지 및 용매 대조군의 세포 생존율은 90 % 이상이어야 한다.
 - 용매 대조군에서, CD86 및 CD54의 RFI 값은 양성의 범위($CD86\ RFI \geq 150\ %$, $CD54\ RFI \geq 200\ %$)를 초과하지 않아야 한다.
 - 배지 및 용매 대조군 모두에서, 각각의 동종형 대조군에 대한 CD86 및 CD54의 MFI 비율은 105 %를 초과하여야 한다.
 - 양성대조군(DNCB)에서 CD86 및 CD54의 RFI 값은 양성 기준($CD86\ RFI \geq 150$, $CD54\ RFI \geq 200$)을 충족해야하고 세포 생존율은 50 % 이상이어야 한다.
 - 시험물질의 경우, 각 실험마다 최소 4 개 시험농도에서의 세포 생존율이 50 % 이상이어야 한다.
 - 음성으로 판단할 경우에는, 시험물질 최고농도의 세포생존율은 90 % 미만이어야 한다.

2. 결과 해석 및 판정

- (1) 적어도 2 회의 독립적인 실험($N=2$)을 실시하여 적어도 1 회는 다음의 조건을 충족하거나, 3 회의 독립적인 실험($N=3$)을 실시하여 적어도 2 회 이상이 다음의 조건을 만족하면 h-CLAT 시험은 양성으로 간주한다. 양성이 아닌 경우 음성으로 간주한다.
- CD86의 RFI가 최소 1 개 이상의 시험 농도에서 150 % 이상(세포 생존율은 50 % 이상)
 - CD54의 RFI가 최소 1 개 이상의 시험 농도에서 200 % 이상(세포 생존율은 50 % 이상)
- (2) $N=2$ 모두 CD86에 대해 양성, 그리고/또는 CD54에 양성인 경우, h-CLAT 예측은 양성으로 간주하며 이때 세 번째 실험은 수행할 필요가 없다. 두 지표에 대해 $N=2$ 모두 음성이면 h-CLAT 예측은 세 번째 실험을 수행할 필요 없이 음성으로 간주된다.
- (3) $N=2$ 의 실험에서 CD54 또는 CD86 중 적어도 하나에 대해 일치하지 않는 경우, 세 번째 실험이 필요하며 마지막 예측은 세 번의 개별 실험(즉, 3 개 중 2 개)의 다수결 결과를 기반으로 한다.

- (4) 시험물질이 양성으로 판정될 경우 선택적으로 2 개의 유효 농도(EC) 값인 CD86에 대한 EC150 값과 CD54에 대한 EC200 값을 아래와 같은 방식으로 구할 수 있다.

$$EC150(\text{for } CD86) = B_{\text{농도}} + [(150 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{농도}} - B_{\text{농도}})]$$

$$EC200(\text{for } CD54) = B_{\text{농도}} + [(200 - B_{RFI}) / (A_{RFI} - B_{RFI}) \times (A_{\text{농도}} - B_{\text{농도}})]$$

$A_{\text{농도}}$ 는 RFI > 150(CD86) 또는 RFI > 200(CD54)인 최저 농도($\mu\text{g/mL}$)

$B_{\text{농도}}$ 는 RFI < 150(CD86) 또는 RFI < 200(CD54)인 최고 농도($\mu\text{g/mL}$)

A_{RFI} 는 RFI > 150(CD86) 또는 RFI > 200(CD54)인 최저 농도에서의 RFI

B_{RFI} 는 RFI < 150(CD86) 또는 RFI < 200(CD54)인 최고 농도에서의 RFI

3. 시험결과의 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

(1) 단일조성물질

- IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 기타 식별자와 같은 화학적 식별
- 물리적 외관, Log Kow, 수용성, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 성질(가능한 범위 내에서)
- 순도, 불순물의 화학적 동일성 등(가능한 경우)
- 전처리(해당되는 경우, 예: 보온, 연삭)
- 시험농도
- 저장 조건 및 안정성
- 각 시험물질에 대한 용매/용제 선택에 대한 타당한 근거

(2) 다조성물질, UVCB 및 혼합물질

- 화학적 동일성, 순도, 정량적 발생 및 관련 물리화학적 성질(가능한 범위 내)
- 물리적 외관, 수용성, DMSO 용해도 및 기타 관련 물리화학적 성질.

- 알려진 조성의 혼합물질/중합체 또는 연구 수행과 관련된 기타 정보의 경우, 분자량 또는 겔보기 분자량
- 전처리(해당되는 경우, 예: 보온, 연삭)
- 시험된 농도(들)
- 저장 조건 및 안정성
- 시험물질에 대한 용매/용제 선택에 대한 타당한 근거

3.4. 양성 대조물질, 음성 대조물질

- (1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및/또는 기타 식별자와 같은 화학적 식별
- (2) 물리적 외관, Log Kow, 수용성, DMSO 용해도, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 성질(가능한 범위 내)
- (3) 순도, 적절하고 실질적으로 실현 가능한 불순물의 화학적 동일성 등
- (4) 전처리(해당되는 경우, 예: 보온, 연삭)
- (5) 시험 농도
- (6) 저장 조건 및 안정성
- (7) 각 시험물질에 대한 용매/용제 선정에 대한 타당한 근거

3.5 시험방법 및 조건

- (1) 시험방법에 대한 설명
- (2) 세포주, 저장 조건 및 공급처
- (3) 기기 설정, 글로불린, 항체 및 세포독성 지표, 유세포분석법
- (4) 시험의 숙련도에 관한 사항

3.6 시험의 성립조건

3.7 시험 절차

- (1) 실행 횟수
- (2) 시험물질의 농도, 적용 및 노출 시간(권장한 것과 다를 경우)
- (3) 노출 지속 시간(권장 노출 시간과 다를 경우)
- (4) 사용된 평가 및 결정 기준에 대한 설명
- (5) 시험 절차의 변경에 대한 설명

3.7 결과

- (1) CV75, MFI, RFI, 세포 생존율
- (2) EC150, EC200(해당되는 경우)
- (3) 자료의 도표화

3.8 결과에 대한 토의

3.9 결론

나. U937 세포주 활성화 시험, U-SENS™

I. 개요

1. 목적

이 시험은 U937 세포주에서 단핵구 및 수지상 세포의 활성화 과정과 관련된 세포 표면 지표인 CD86의 발현 변화를 평가하고, 이를 바탕으로 피부 과민성 물질과 비과민성 물질을 판정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 피부과민성

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2 자극 지수(S.I., stimulation index)

용매 처리군 세포에 대한 시험물질 처리군 세포에서의 평균 형광 강도의 상대 값

2.3 CV70

70 %의 세포 생존율을 나타낼 것으로 추정되는 농도

2.4 EC150

CD86 발현의 S.I 값이 150 %를 나타낼 것으로 추정되는 농도

2.5 드리프트(drift)

드리프트는 다음의 두 가지 경우를 정의. i) 미처리 대조군 반복구 3의 보정된 CD86⁺ 값(%)이 미처리 대조군 반복구 1 및 반복구 2의 보정된 CD86⁺ 평균값의 50 % 미만인 경우, 또는 ii) 음성 대조군 반복구 3의 보정된 CD86⁺ 값이 음성 대조군 반복구 1 및 2의 보정된 CD86⁺ 평균값의 50 % 미만인 경우를 의미함.

II. 시험

1. 고려사항

U-SENSTM 시험에 대한 검증 결과, 이 시험은 피부과민성을 나타내는 물질을 구분하는 데 유용한 것으로 확인되고 있다. 그러나, 화학물질의 과민성을 분류하는 데 있어서는 이 시험방법에 의한 결과만을 단독으로 사용하는 것보다는 이외의 다른 과민성 시험법의 결과를 같이 사용하여 판단하는 것이 좋다. 더구나, 국소림프절 시험(LLNA, local lymph node assay) 등 동물을 이용한 과민성 시험법에 의한 결과 또한 사람에게 적용하는 데는 한계가 있다는 점을 감안할 때, 이 시험과 같이 생체 외(*in vitro*) 시험법을 사람에게 바로 적용하는 것은 한계가 있다.

2. 원리

인간 림프종 세포주인 U937 세포를 시험물질에 노출시킨 후, FITC로 표지된 항 CD86 항체로 세포 염색 후 유세포분석법에 의해 측정함으로써, U937 활성화의 전형적 지표 중 하나인 CD86 세포 표면 표지 발현을 평가한다. CD86 발현의 정도에 따라 과민성 물질과 비과민성 물질을 판정한다.

3. 시험의 준비

3.1 세포주

- (1) U937은 해동 후 7 주까지 증식시켜 사용할 수 있으며, 계대 배양 수는 21을 초과하지 않아야 한다.
- (2) 동결 세포의 해동 후 최소 1 주일 이후에 양성 대조물질인 picrylsulfonic acid(TNBS, 2,4,6-trinitro-benzene-sulfonic acid)와 음성 대조물질인 lactic acid(LA)에 대한 반응성을 확인한다. TNBS는 CD86의 양성 및 농도 관련 반응을 일으켜야 하며, LA는 음성 반응을 나타내어야 한다. 반응성 확인을 2 회 통과한 세포주만을 시험에 사용하여야 한다.

- (3) U937 세포는 3×10^5 세포/mL 또는 6×10^5 세포/mL의 밀도로 각각 48 시간 또는 24 시간 동안 예비 배양한다. 세포를 회수한 후, 신선한 배양배지를 이용하여 5×10^5 세포/mL의 농도로 재현탁 시킨 후 100 μ L(0.5×10^5 세포/웰)씩 96-웰 플레이트(웰의 바닥이 평평한 것)에 분주한다.

3.2 시험물질

- (1) 시험물질이 50 mg/mL의 농도로 배지에 용해되는지 여부를 확인한다. 배지에서 용해되는 경우, 0.4 mg/mL의 최종 농도로 용해시킨다.
- (2) 시험물질이 배지에 용해되지 않고 DMSO에만 용해된다면, 50 mg/mL의 최종 농도로 DMSO에 용해시킨다.

3.3 음성 대조물질

음성 대조물질로는 lactic acid(LA)를 사용하며, 배지에 200 μ g/mL의 농도가 되도록 용해시켜 사용한다.

3.4 양성 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 picrylsulfonic acid(TNBS, 2,4,6-Trinitro-benzene-sulfonic acid)를 사용한다.
- (2) 플레이트 중의 TNBS 농도가 50 μ g/mL가 되도록 하기 위해, 배지로 TNBS 1 M 용액(293 mg/mL)을 제조하고, 100 μ g/mL의 농도가 되도록 배지로 2,930 배 희석한다.

3.5 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 본시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 10 가지 숙련도 물질 중 8 가지 이상에 대해 각각의 기준 범위 내로 들어오는 CV70 및 EC150 값을 얻음으로써 숙련도를 입증해야 한다.

표 1. 생체 외 피부과민성시험(U-SENS™ 시험)에 대한 숙련도 시험물질 및 그 결과

숙련도 물질	CAS 번호	상태	생체 내 예측	U-SENS™ 용매/용제	기준 범위 ($\mu\text{g/mL}$)	
					CV70	EC150
4-Phenylenediamine	106-50-3	고체	과민성물질 (강함)	배지	< 30	양성 (≤ 10)
Picryl sulfonic acid	2508-19-2	액체	과민성물질 (강함)	배지	> 50	양성 (≤ 50)
Diethyl maleate	141-05-9	액체	과민성물질 (중간정도)	DMSO	10 ~ 100	양성 (≤ 20)
Resorcinol	108-46-3	고체	과민성물질 (중간정도)	배지	> 100	양성 (≤ 50)
Cinnamic alcohol	104-54-1	고체	과민성물질 (약함)	DMSO	> 100	양성 (10 ~ 100)
4-Allylanisole	140-67-0	액체	과민성물질 (약함)	DMSO	> 100	양성 (< 200)
Saccharin	81-07-2	고체	비과민성물질	DMSO	> 200	음성 (> 200)
Glycerol	56-81-5	액체	비과민성물질	배지	> 200	음성 (> 200)
Lactic acid	50-21-5	액체	비과민성물질	배지	> 200	음성 (> 200)
Salicylic acid	69-72-7	고체	비과민성물질	DMSO	> 200	음성 (> 200)

4. 시험 방법

시험물질의 양성 또는 음성 판정을 위해서는 4 개 이상의 농도에 대해 2 회 이상 반복하여 실험하여야 한다. 각각의 실험은 서로 다른 날에 하여야 하며 시험 물질은 시험 당일에 조제하여야 한다. 시험에 사용되는 세포주는 각각 독립적으로 배양 증식한 것이어야 한다.

4.1 시험물질의 노출

준비된 시험물질과 대조물질 용액을 세포현탁액과 1:1(v:v)로 96-웰 플레이트(웰의 바닥이 평평한 것)에서 혼합한 후, 37 °C, 5 % CO₂ 하에서 45 시간 \pm 3 시간 동안 배양한다.

4.2 세포 염색

- (1) 45 시간 \pm 3 시간의 노출 후, 세포를 원심분리하여 수집한다.
- (2) 수집한 세포를, 5 % 우태아혈청을 포함한 100 μL 인산염 완충 식염수(PBS, phosphate buffered saline)인 염색 완충액으로 한 번 세척한다.
- (3) 원심분리 후, 세포를 100 μL 의 염색 완충액으로 재현탁하고, 빛으로부터 차단

된 4 °C에서 30 분 동안 FITC가 표지된 항-CD86 또는 마우스 IgG1(동종형) 항체 5 μL로 염색한다.

- (4) 염색 완충액 100 μL로 2 회 세척하고 차가운 PBS 100 μL 로 1 회 세척한 후, 세포를 차가운 PBS(예: 튜브를 수동으로 분석하는 샘플의 경우 125 μL, 자동 샘플 플레이트를 사용하는 경우 50 μL)에 재현탁하고, propidium iodide(PI) 용액(최종 농도 3 μg/mL)을 첨가한다.

4.3 유세포분석법

- (1) CD86의 발현 수준 및 세포 생존율을 유세포분석법을 사용하여 분석한다.
- (2) CD86-양성(CD86+) 세포의 백분율을 살아있는 세포 중에서 측정한다.
- (3) 대조군 세포(미처리군 또는 0.4 % DMSO) 및 시험물질 처리된 세포에 대한 CD86의 자극 지수(S.I.)는 다음 식에 따라 계산한다.

$$S.I. = \frac{\text{시험물질 처리된 세포 중 } CD86^{+} \text{ 의 } \% - \text{시험물질 처리된 세포 중 } IgG1^{+} \text{ 의 } \%}{\text{대조군 세포 중 } CD86^{+} \text{ 의 } \% - \text{대조군 세포 중 } IgG1^{+} \text{ 의 } \%} \times 100$$

III. 시험결과 및 보고

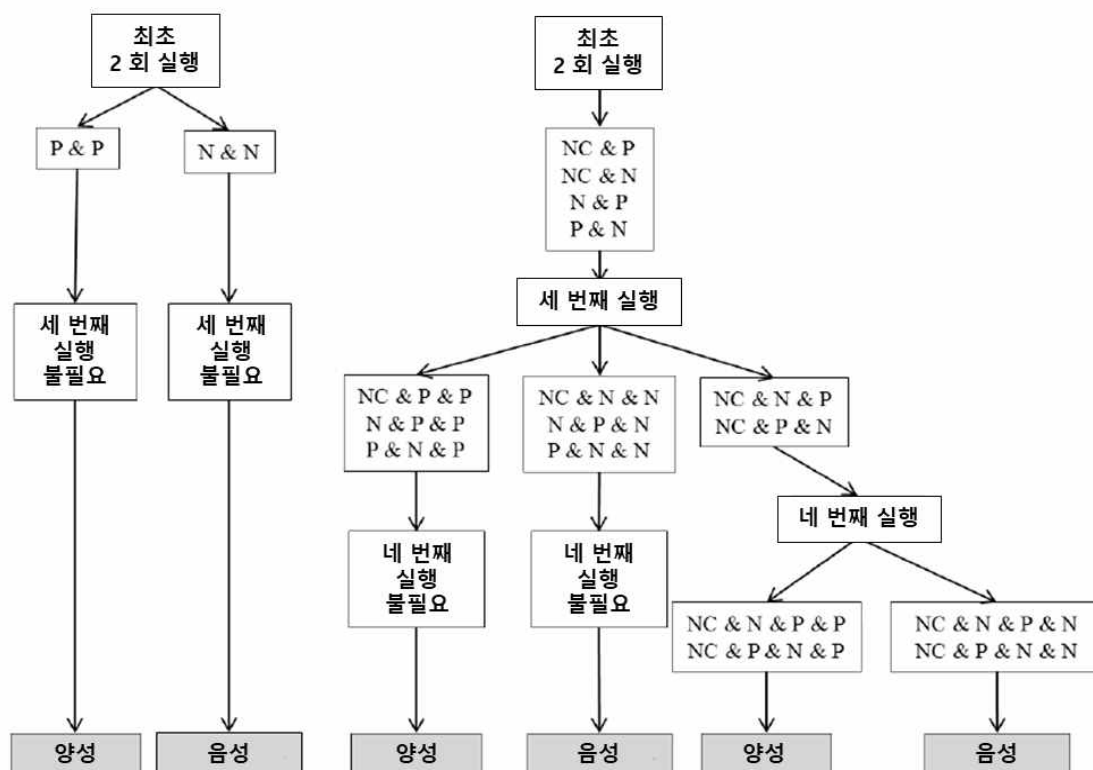
1. 시험의 성립조건

- (1) 노출 기간이 끝났을 때, 미처리군 세포의 평균 생존율은 90 % 이상이어야 하고 CD86 발현의 드리프트(drift)는 관찰되지 않아야 한다. 미처리군 세포의 CD86 기저 발현은 2 % 이상 25 % 이하의 범위 내에 있어야 한다.
- (2) DMSO를 용제로 사용하는 경우, 세포의 평균 생존율은 90 % 이상이어야 한다. DMSO 용제 대조군은, CD86의 자극 지수(S.I.) 평균값이 미처리군 세포 평균값의 250 %보다 작으면 유효하다.
- (3) 미처리군 세포의 3 개 IgG1 값 중 적어도 2 개가 0.6 % 이상 1.5 % 미만의 범위 내로 들어오면 실행은 유효한 것으로 간주된다.
- (4) 음성 대조군은 3 회 반복 중 2 회 이상이, 음성 결과를 보이고(CD86의 S.I. < 150 %), 세포독성은 보이지 않을 때(세포 생존율 70 % 이상), 유효한 것으로 간주된다.
- (5) 양성 대조군은 3 회 반복 중 2 회 이상이 양성 결과를 보이고(CD86의 S.I. ≥ 150 %), 세포독성은 보이지 않을 때(세포 생존율 70 % 이상), 유효한 것으로 간주된다.

2. 결과 해석 및 판정

- (1) CD86의 자극 지수(S.I.)가 세포 독성이 없는(세포 생존율 $\geq 70\%$) 모든 농도에서 150 % 미만인 경우, 결과는 음성(N)으로 간주된다. 반면, CD86의 자극 지수(S.I.)가 세포 독성이 없는(세포 생존율 $\geq 70\%$) 모든 농도에서 150 % 이상인 경우, 결과는 양성(P)으로 간주된다.
- (2) 적어도 두 개의 독립 실행이 음성인 경우 결과는 음성으로 간주되며, 첫 두 실행이 모두 음성일 경우, 세 번째 실행은 수행할 필요가 없다. 반면, 적어도 두 개의 독립 실행이 양성인 경우 결과는 양성으로 간주되며, 첫 두 실행이 모두 양성일 경우, 세 번째 실행은 수행할 필요가 없다(그림 1).
- (3) 첫 번째 실행에서, 가장 높은 비세포독성 농도에서만 CD86의 자극 지수(S.I.)가 150 % 이상인 경우에는 ‘결정할 수 없음(NC, not conclusive)’으로 간주된다. 이 경우, 적어도 2 회 더 실행해야 하며, 두 번째, 세 번째 실행 결과가 일치하지 않는 경우에는 네 번째 실행을 수행해야 하며, 다만, 한 개의 비세포독성 농도만이 150 % 이상의 CD86의 자극 지수를 보이는 경우라 하더라도, 이후 실행에서는 양성으로 간주한다(그림 1).
- (4) 최종 예측은 3 회 ~ 4 회의 개별 실행 결과에 대한 다수결을 기반으로 한다(그림 1).

그림 1. U-SENS™ 시험방법에 사용되는 결과 예측 모델



3. 시험결과와 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

(1) 단일조성물질

- IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및 기타 식별자와 같은 화학적 식별, 물리적 외관, LogKow, 수용성, 분자량 및 기타 관련 물리화학적 성질, 순도, 불순물, 전처리 여부, 시험농도, 저장 조건 및 안정성, 용매, 용매선택의 근거

(2) 다조성물질, UVCB 및 혼합물질

- 특성. 화학적 동일성, 순도, 물리화학적 성질, 물리적 외관, 수용성, 조성의 혼합물질, 분자량 또는 겉보기 분자량, 전처리 여부, 시험농도, 저장 조건 및 안정성, 용매, 용매선택의 근거

3.4 양성 및 음성 대조물질

(1) 위 시험물질과 동일한 수준의 정보

(2) 기존의 양성 및 음성 대조군에 대한 실험결과(참고문헌 표기)

3.5 시험의뢰자 및 시험기관에 대한 정보

3.6 시험 방법 및 조건

(1) 시험방법에 대한 설명

(2) 세포주, 보관 조건 및 구입처

(3) 기기

(4) 실험 횟수

(5) 시험물질 농도, 노출 방법 및 시간

(6) 판정기준

(7) 시험절차의 변경(있을 경우)

3.7 실험실 숙련도

3.8 결과

3.9 토의

3.10 결론

다. IL-8 루시퍼라제 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 THP-G8 세포주에서의 루시퍼라제 활성을 측정하여 수지상 세포를 활성화시키는 IL-8의 유전자 발현을 평가하고, 이를 바탕으로 피부과민성 물질과 비과민성 물질을 판정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 피부과민성

감수성이 있는 개체가 알레르기 유발 화학물질에 경피노출 되었을 때 나타나는 면역학적 과정

2.2 IL-8(interleukin-8)

호중구 및 T 세포 림프구의 주화성을 일으키는 사이토카인으로 내피 세포, 섬유아세포, 각질세포, 대식세포 및 단구에서 유래

2.3 IL8LA

IL-8 유전자 발현에 의해 조절되는 안정적 루시퍼라제 오렌지(SLO, stable luciferase orange)의 활성

2.4 GAPLA

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH) 유전자 발현에 의해 조절되는 안정적 루시퍼라제 레드(SLR, stable luciferase red)의 활성. 세포 생존율과 살아있는 세포 수를 반영함.

2.5 nIL8LA

안정적 루시퍼라제 레드의 활성에 의해 보정된 안정적 루시퍼라제 오렌지의 활성(IL8LA/GAPLA)

2.6 Ind-IL8LA(induction of IL8LA)

대조군 nIL8LA에 대한 시험물질 처리군 nIL8LA의 비율

2.7 Inh-GAPLA(inhibition of GAPLA)

GAPLA의 억제를 나타내며 시험물질의 독성지표임. 대조군의 GAPLA에 대한 시험물질 처리군 GAPLA의 비율로 구한다.

2.8 CV05

Inh-GAPLA 0.05 미만으로 나타나는 시험물질의 최저 농도

II. 시험

1. 고려사항

IL-8 루시퍼라제 시험에 대한 검증 결과, 이 시험은 피부과민성을 나타내는 물질을 구분하는 데 유용한 것으로 확인되고 있다. 그러나, 화학물질의 과민성을 분류하는 데 있어서는 이 시험방법에 의한 결과만을 단독으로 사용하는 것보다는 이 외의 다른 과민성 시험법의 결과를 같이 사용하여 판단하는 것이 좋다. 더구나, 국소림프절 시험(LLNA, local lymph node assay) 등 동물을 이용한 과민성 시험법에 의한 결과도 사람에게 적용하는 데는 한계가 있다는 점을 감안할 때, 이 시험과 같이 생체 외(*in vitro*) 시험법을 사람에게 바로 적용하는 것은 한계가 있다.

2. 원리

IL-8 유전자 발현의 지표인 SLO와 GAPDH 유전자 발현의 지표인 SLR이 존재하는 THP-G8 세포주에 시험물질을 노출시킨 후 루시퍼라제 발광기질을 이용하여 SLO와 SLR의 발현을 측정함으로써 IL-8 및 GAPDH의 유전자 발현을 평가한다. IL-8 유전자 발현의 정도에 따라 과민성 물질과 비과민성 물질을 판정한다.

3. 시험의 준비

3.1 세포주

- (1) THP-G8 세포는 GPC 연구소(Tottori, Japan)로부터 구입할 수 있다. 세포주를 수령한 후 세포를 2 계대 ~ 4 계대 증식시키고 균일하게 분주한 후 동결 보관한다. 동결 균주는 최대 12 계대 또는 최대 6 주까지 증식시켜 시험에 사용한다.

- (2) 동결 세포의 해동 후 1 주 ~ 2 주 후 또는 2 계대 ~ 4 계대 배양 후에 양성 대조물질인 4-nitrobenzylbromide(4-NBB)와 음성 대조물질인 lactic acid(LA)에 대한 반응성을 확인한다. 4-NBB의 Ind-IL8LA는 1.4 이상이어야 하며, LA의 ind-IL8LA는 1.4 미만이어야 한다. 이 기준에 맞는 세포주 만을 시험에 사용한다.
- (3) THP-G8 세포는 2×10^5 세포/mL ~ 5×10^5 세포/mL의 밀도로 48 시간 ~ 96 시간 동안 예비 배양한다. 세포를 회수한 후 10 % 혈청(FBS, fetal bovine serum)이 함유된 RPMI-1640(항생제는 미포함)으로 세척하고 1×10^6 세포/mL의 농도로 재현탁 시킨 후 50 μ L(5×10^4 세포/웰)씩 96-웰 플레이트(흑색이고 웰의 바닥은 평평한 것)에 분주한다.

3.2 시험물질

- (1) 시험물질 20 mg을 원심분리용 마이크로 튜브에 넣고 X-VIVO™15 배지 1 mL을 가한 후 격렬히 교반하고 8 rpm으로 30 분간 흔들어 준 후 가용성 여부를 확인한다. 불용성 고체물질이 남아 있는 경우 시험물질이 완전히 녹거나 또는 안정적으로 분산될 때까지 원심분리 튜브를 초음파로 처리하고 가용성 여부를 재차 확인한다.
- (2) 가용성인 경우 X-VIVO™15 배지를 사용하여 5 배 희석하고 이를 시험물질의 저장용액(stock solution)으로 한다(4 mg/mL).
- (3) 불용성인 경우 원심분리 튜브를 최소 30 분 동안 다시 흔들고 20,000 g로 5 분간 원심분리한 후 상등액을 저장용액으로 사용한다.

3.3 음성 대조물질

- (1) 음성 대조물질로는 lactic acid(LA)를 사용하며 마이크로 원심분리 튜브에 20 mg의 LA를 넣고 X-VIVO™15 배지 1 mL를 첨가하여 용해시킨 후 다시 5 배 희석한다.
- (2) 이 용액(4 mg/mL) 500 μ L를 96 웰 플레이트에 분주한 후 플레이트 상에서 2 배수로 계열 희석하여 2 mg/mL 및 1 mg/mL 용액을 조제한다.

3.4 양성 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 4-nitrobenzylbromide(4-NBB)를 사용하며 마이크로 원심분리 튜브에 20 mg의 4-NBB를 넣고 X-VIVO™15 배지 1 mL를 첨가한 후 격렬히 교

반한 후 8 rpm으로 30 분간 흔들어 준 후 20,000 g로 5 분간 원심분리하고 상
등액을 저장용액으로 사용한다.

- (2) 저장용액을 X-VIVO™15 배지로 4 배 희석한 후 500 μ L를 96 웰 플레이트에
분주한 후 플레이트 상에서 2 배 및 4 배 희석시킨 용액을 조제한다.

3.5 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 본시험에
대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 9 종의
숙련도 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표 1에 제시된 결과와 일치하는 지
를 확인한다.

표 1. 생체 외 피부과민성시험(IL-8 루시퍼라제 시험)에 대한 숙련도 시험물질 및 그 결과

숙련도 물질	CAS 번호	상태	20 mg/mL일 때 X-VIVO15 에서의 용해도	생체 내 예측	IL-8 루시퍼라 제 예측	기준 범위 (μ g/mL)	
						CV05	IL-8 루시퍼라제 MIT*
2,4-Dinitrochloroben zene	97-00-7	고체	불용성	과민성물질 (극심함)	양성	2.3 ~ 3.9	0.5 ~ 2.3
Formaldehyde	50-00-0	액체	수용성	과민성물질 (강함)	양성	9 ~ 30	4 ~ 9
2-Mercaptobenzothi azole	149-30-4	고체	불용성	과민성물질 (중간정도)	양성	250 ~ 290	60 ~ 250
Ethylenediamine	107-15-3	액체	수용성	과민성물질 (중간정도)	양성	500 ~ 700	0.1 ~ 0.4
Ethyleneglycol dimethacrylate	97-90-5	액체	불용성	과민성물질 (약함)	양성	> 2,000	0.04 ~ 0.1
4-Allylanisole(estrag ol)	140-67-0	액체	불용성	과민성물질 (약함)	양성	> 2,000	0.01 ~ 0.07
Streptomycin sulphate	3810-74-0	고체	수용성	비과민성 물질	음성	> 2,000	> 2,000
Glycerol	56-81-5	액체	수용성	비과민성 물질	음성	> 2,000	> 2,000
Isopropanol	67-63-0	액체	수용성	비과민성 물질	음성	> 2,000	> 2,000

* MIT(minimum induction threshold): 화학물질이 양성 기준을 충족하는 최저 농도

4. 시험 방법

시험물질의 양성 또는 음성 판정을 위해서는 2 회 ~ 4 회 반복하여 실험하여야 한다. 각각의 실험은 서로 다른 날에 하여야 하며 시험물질은 시험 당일에 조제하여야 한다. 시험에 사용되는 세포주는 각각 독립적으로 배양 증식한 것이어야 한다.

4.1 시험물질의 노출

4.1.1 제 1 차 실험

- (1) 제 1 차 실험은 시험물질의 세포독성 및 피부과민성 유발 가능성에 대한 사전 조사를 목적으로 실시하며 이를 위해 우선 시험물질의 저장용액(4 mg/mL)을 2 배수로 다단계 계열 희석한다(예, 10 단계).
- (2) 시험물질 노출은 계열 희석된 각각의 용액 50 μ L와 THP-G8 세포 배양액 50 μ L를 혼합하여 실시하며, 이때 시험물질의 최종 농도는 0.002 mg/mL ~ 2 mg/mL 범위로 설정된다.
- (3) 각 농도로부터 Inh-GAPLA를 구하여 도식화하고 CV05에 해당하는 시험물질의 농도를 구한다.
- (4) 시험물질이 불용성인 경우의 저장용액은 앞에서 기술한 바와 같이 원심분리 튜브를 최소 30 분 동안 다시 흔들고 20,000 g로 5 분간 원심분리한 후 상등액을 저장용액으로 사용하되, 노출방법은 가용성 시험물질과 동일하다.

4.1.2 후속 실험(2 차, 3 차 및 4 차 실험)

- (1) 후속 실험에서의 저장용액은 제 1 차 시험의 결과로부터 얻는 CV05에 해당하는 농도보다 4 배 높은 농도로 한다. 제 1 차 시험의 최고 농도에서 inh-GAPLA가 0.05 미만으로 나타나지 않을 경우, 후속시험에서의 저장용액은 제 1 차 시험의 최고 농도로 한다.
- (2) 최고 농도로부터 1.5 배 희석배수를 적용하여 다단계 계열 희석하고(예, 10 단계) 계열 희석된 각각의 용액 50 μ L와 THP-G8 세포 배양액 50 μ L를 혼합하여 시험물질을 노출시킨다.

4.2 양성 및 음성 대조물질의 노출

각각에 대해 조제한 저장용액으로부터 계열 희석된 각각의 용액(저장용액 포함

하여 3 개 농도) 50 μ L와 THP-G8 세포 배양액 50 μ L를 혼합하여 대조물질을 노출시킨다.

4.3 반응

시험물질, 음성 및 양성 대조물질의 각 농도마다 4 개의 웰에 대해 노출시키도록 플레이트를 배치한다. 시험물질, 음성 및 양성 대조물질을 THP-G8 세포 현탁액에 가한 후 플레이트 진탕기 위에서 잘 흔들어 주고 37 $^{\circ}$ C 및 5 % CO₂에서 16 시간 동안 배양한다. 배양 후 루시퍼라제 활성을 측정한다.

4.4 루시퍼라제 활성 측정

- (1) 발광은 광학 필터가 장착된 96-웰 마이크로 플레이트 발광측정기(luminometer)를 사용하여 측정한다.
- (2) 루시퍼라제 측정용 시약(Tripluc[®]) 100 μ L를 각 웰에 넣고 플레이트를 실온에서 10 분 동안 진탕시킨다. 플레이트를 발광측정기에 놓고 SLO 및 SLR의 활성 측정에 적절한 파장과 필터를 사용하여 루시퍼라제 활성을 측정한다.
- (3) 측정값으로부터 IL8LA, GAPLA, nIL8LA, Ind-IL8LA 및 Inh-GAPLA 등 시험물질의 판정에 필요한 지표 값을 구한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험의 성립조건

- (1) 양성 대조군(4-NBB)의 Ind-IL8LA 값은 매 실험마다 사용한 농도 중 적어도 한 개 이상의 농도에서 5.0 이상이어야 한다.
- (2) 음성 대조군(LA)의 Ind-IL8LA 값은 매 실험마다 사용한 농도 중 적어도 한 개 이상의 농도에서 1.4 미만이어야 한다.
- (3) 배지 대조군(배지 + 세포 + 발광시약)의 GAPLA 값이 배지만을 함유한 무시험군(배지 + 발광시약)의 GAPLA 값에 비해 5 배 이상이어야 한다.
- (4) 시험물질 및 대조물질의 모든 농도에서의 Inh-GAPLA값은 0.05 이상이어야 한다.

2. 결과 해석 및 판정

- (1) Ind-IL8LA 값이 1.4 이상이고 95 % 신뢰구간의 하한 값이 1.0 이상인 경우에 해당 시험물질은 양성으로 판정한다.

- (2) Ind-IL8LA 값이 1.4 미만이고 95 % 신뢰 구간의 하한 값이 1.0 미만인 경우에 해당 시험물질은 음성으로 판정한다.
- (3) 1 차, 2 차, 3 차 또는 4 차 실험 중 2 개의 양성 결과를 나타내는 경우에는 양성으로 판정하며 3 개의 음성 결과를 나타내는 경우에는 음성으로 판정한다. (표 2 참조)
- (4) 음성의 결과를 나타내는 시험물질 중 X-VIVO™15 배지에 20 mg/mL의 농도로 용해되는 경우에는 음성으로 판정하며, 용해되지 않는 경우에는 음성으로 판정하지 않는다.

표 2. 각 시험의 판정에 근거한 양성 및 음성 추정의 최종 판정기준

1 회	2 회	3 회	4 회	최종 예측
양성	양성	-	-	양성
	음성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
음성	양성	양성	-	양성
		음성	양성	양성
			음성	음성 추정
	음성	양성	양성	양성
			음성	음성 추정
		음성	-	음성 추정

3. 시험결과의 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

(1) 단일조성물질

- IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 및 기타 식별자와 같은 화학적 식별, 물리적 외관, LogKow, 수용성, 분자량 및 기타 관련

물리화학적 성질, 순도, 불순물, 전처리 여부, 시험농도, 저장 조건 및 안정성, 용매, 용매선택의 근거

(2) 다조성물질, UVCB 및 혼합물질

- 특성. 화학적 동일성, 순도, 물리화학적 성질, 물리적 외관, 수용성, 조성의 혼합 물질, 분자량 또는 겔보기 분자량, 전처리 여부, 시험농도, 저장 조건 및 안정성, 용매, 용매선택의 근거

3.4 양성 및 음성 대조물질

- (1) 위 시험물질과 동일한 수준의 정보
- (2) 기존의 양성 및 음성 대조군에 대한 시험결과(참고문헌 표기)

3.5 시험의뢰자 및 시험기관에 대한 정보

3.6 시험 방법 및 조건

- (1) 시험방법에 대한 설명
- (2) 세포주, 보관 조건 및 구입처
- (3) 기기
- (4) 실험 횟수
- (5) 시험물질 농도, 노출 방법 및 시간
- (6) 판정기준
- (7) 시험절차의 변경(있을 경우)

3.7 실험실 숙련도

3.8 결과

3.9 토의

3.10 결론

제61항 안드로겐수용체 전사활성 시험

가. AR-EcoScreen™세포를 이용한 안드로겐수용체 전사활성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 안드로겐수용체(AR, androgen receptor)의 전사활성을 측정함으로써 안드로겐 작용물질과 길항물질을 동정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 안드로겐 활성(androgen activity)

안드로겐수용체와의 결합을 활성화시키는 화학물질의 능력

2.2. 작용물질(agonist)

안드로겐수용체에 결합하여 안드로겐과 유사한 생물학적 반응을 일으키는 물질

2.3 길항물질(antagonist)

스스로 생물학적 반응을 유발하지는 않으나 안드로겐수용체에 결합하여 작용물질의 반응을 차단 또는 감소시키는 물질

2.4 EC₅₀

최고반응의 50 %를 나타내는 작용물질의 농도

2.5 PC₅₀

작용물질 활성측정시험에서 양성 대조물질(10 nM DHT)에 의해 유도되는 반응의 50 %를 나타내는 시험물질의 농도

2.6 IC₅₀

길항물질 활성측정시험에서 500 pM DHT에 의해 유도되는 최대반응의 50 %를 저해하는 시험물질의 농도

2.7 AG_{ref}

길항물질 활성측정시험에서 작용반응을 유도하는 물질, 500 pM DHT

2.8 PC_{AGO}

작용반응의 양성 기준물질, 10 nM DHT

2.9 PC_{ATG}

길항반응의 양성 기준물질, 500 pM DHT 및 1 µM hydroxyflutamide (HF)

2.10 PC_{CT}

세포독성 양성 기준물질, 10 µg/mL cycloheximide

2.11 RPC_{max}

시험물질이 나타내는 최대 반응으로, 작용반응 양성 기준물질 PC_{AGO}(10 nM DHT)에 의해 유도되는 반응에 대한 상대적인 비율로 표현

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 세포주를 사용한 생체 외(*in vitro*) 시험법이므로 그 결과를 생체 내(*in vivo*)의 반응과 직접 연관시킬 수는 없다. 또한 세포주의 대사능력에 한계가 있으므로 대사체보다는 주로 모화합물에 대한 영향을 나타낼 가능성이 크다. 시험에 사용하는 AR-EcoScreen™ 세포주는 안드로젠수용체(AR)에 대한 반응을 평가할 목적으로 개발되었으나 글루코코르티코이드 수용체(GR, glucocorticoid receptor)에 대해서도 최소한의 수준으로 상호 작용할 수도 있으므로 양성반응의 경우 이에 대한 검토가 필요하다.

2. 원리

(1) 안드로젠수용체(AR)와 시험물질의 상호작용을 평가하기 위한 수단으로서 AR의 활성화에 의해 조절되는 리포터 유전자의 전사활성을 측정한다. 이 방법을 통해 AR의 활성을 증가시키거나 억제하는 화학물질에 대한 정보를 획득할 수

있다.

(2) 세포주에는 AR 활성을 측정하는 데 이용되는 반딧불이 루시페라제 리포터 (firefly luciferase reporter) 유전자와 세포독성평가에 이용되는 레닐라 루시페라제 리포터(renilla luciferase reporter) 유전자가 도입되어 있으므로 시험물질의 AR 활성과 아울러 세포독성에 의한 영향을 동시에 파악할 수 있다. 루시페라제의 활성은 기질의 대사에 따른 발광정도를 발광광도계에서 정량적으로 측정함으로써 가능하다.

3. 시험의 준비

3.1 실험실 숙련도 시험

- (1) AR 작용물질(8 종, 표 1-1)과 길항물질(9 종, 표 1-2)을 사용하여 숙련도 시험을 실시한다.
- (2) 숙련도 시험은 최소한 2 회 이상 실시하되, 서로 다른 날에 실시한다.
- (3) 숙련도 시험결과는 표 1-1과 표 1-2에서 제시된 각각의 숙련도 기준 ($\log PC_{10}$, $\log PC_{50}$ 의 농도범위)에 적합해야 하며 편차가 있을 경우에는 그 타당한 사유를 기술한다.

3.2 세포주

- (1) 안정적으로 형질주입된 AR-EcoScreen™ 세포주를 사용한다.
- (2) 마이코플라스마에 오염되지 않은 세포만을 사용한다.

3.3 세포의 안정성

- (1) 시험에 사용하는 세포주의 AR-매개 반응이 시간의 경과에도 불구하고 온전하게 유지되는지를 평가하기 위해 양성/음성 대조물질을 사용하여 세포의 안정성을 모니터링 한다.
- (2) AR 작용물질의 분석시험에 사용할 세포주의 안정성을 모니터링하기 위해서는 DHT 및 mestanolone를 양성 대조물질로, di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)를 음성 대조물질로 사용한다. 3 종 기준물질에 대한 농도반응 곡선을 매 시험마다 최소 1 회 측정하며 시험결과는 표 2-1에 제시된 기준을 만족해야 한다.
- (3) AR 길항작용을 측정하기 위한 세포주의 안정성을 모니터링하기 위해서는 HF 및 bisphenol A (BPA)를 양성 대조물질로, DEHP를 음성 대조물질로 사용한다.

3 종 기준물질에 대한 농도반응 곡선을 매 시험마다 최소 1 회 측정하며 시험 결과는 표 2-2에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4. 시험 방법

4.1 세포의 배양

- (1) 시험방법에 따라 규정된 세포주에 적합한 배지로 배양하며, 세포 배양밀집도가 75 % ~ 90 %에 도달했을 때 계대 배양한다. 세포 반응의 적정성을 유지하기 위해서 40 회 이상 계대 배양하지 않으며, AR-EcoScreen™ 세포주의 경우 3 개월까지는 안정하다.
- (2) 1×10^5 세포/mL의 밀도로 조정된 세포액을 96-웰 플레이트에 웰당 90 μ L(9×10^3 세포)씩을 취하여 분주한다. 세포는 시험물질 노출 전에 $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 에서 5 % CO_2 배양기에서 24 시간 동안 미리 배양해야 한다.

4.2 용매

시험물질은 적절한 용매에 잘 녹을 수 있고, 세포의 배지와 쉽게 섞일 수 있어야 한다. 시험물질의 용매 및 용제로는 물, dimethyl sulfoxide (DMSO), ethanol(95 % ~ 100 %) 등이 적절하다. DMSO의 배지 중 최종농도는 0.1 %(v/v)를 넘지 않아야 한다. 용매 및 용제는 최고 농도에서 세포독성을 나타내지 않으며 시험의 과정에 간섭하지 않아야 한다.

4.3 기준물질과 양성/음성 대조물질

4.3.1 작용물질 시험에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 5α -dihydrotestosterone (DHT)와 mestanolone을 사용한다.
- (2) 음성 대조물질로는 di(2-Ethylhexyl)phthalate (DEHP)를 사용한다.
- (3) 작용물질 활성측정시험에 사용하는 양성 기준물질(PC_{AGO})은 10 nM DHT를 사용한다. PC_{AGO} RLU (relative light unit, 상대발광단위) 평균값을 용매대조군 (VC, vehicle control)의 RLU 평균값으로 나눈 유도 배율은 6.4 이상이어야 하며 PC₁₀에서의 유도 배율은 용매대조군 유도 배율의 $1 + 2 \text{ SD}$ (편차) 값보다 커야 한다.
- (4) 양성 및 음성 대조물질의 시험결과는 표 2-1에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4.3.2 길항물질 시험에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 hydroxyflutamide (HF)와 bisphenol A (BPA)를 사용한다.
- (2) 음성 대조물질로는 DEHP를 사용한다.
- (3) 길항물질 활성측정시험에서 작용반응을 유도하는 물질(AG_{ref})은 500 pM DHT를 사용하며 최대 RLU 평균값을 용매 대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때의 유도 배율은 5.0 이상이어야 한다. 길항반응의 양성 기준물질(PC_{ATG})은 500 pM DHT 및 1 μ M HF를 사용하며 이때 용매 대조군 RLU로 보정한 PC_{ATG} RLU의 평균값은 용매 대조군 RLU로 보정한 AG_{ref} 의 RLU 평균값에 비해 46 % 미만이어야 한다.
- (4) 양성 및 음성 대조물질의 시험결과는 표 2-2에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4.4 시험물질의 준비

시험물질은 적절한 용제(DMSO)에 용해하고 동일한 용제로 1:10의 비율로 순차적으로 희석한다.

4.5 농도범위 설정을 위한 용해도와 세포 독성

- (1) 시험물질의 최대 농도를 결정하기 위해 용해도 시험을 수행한다.
- (2) 가장 높은 농도 범위를 사용했을 때, 배양 배지에서 침전이 일어나지 않는 농도 중 최대 농도를 선택한다.
- (3) 시험물질에 의한 세포독성은 AR 길항물질과 작용물질의 측정결과를 왜곡시킬 수 있으므로 시험물질에 대한 세포독성을 확인해야 하며 전사활성 및 세포독성에 대한 측정은 동일한 분석 플레이트에서 동시에 수행한다. 세포독성 양성 기준물질로는 10 μ g/mL cycloheximide를 사용한다.
- (4) 세포독성 시험 결과 시험물질의 농도가 레닐라 루시퍼라제 활성을 20 % 이상 감소시킨 경우, 세포독성이 있다고 간주하고 그 이상의 농도는 사용하지 않는다.

4.6 시험물질의 노출

- (1) 1×10^5 세포/mL의 밀도로 조정된 세포액을 96-웰 플레이트에 웰당 90 μ L(9×10^3 세포)씩을 취하여 분주한 후 24 시간 동안 배양한 세포에 농도별 3 개 웰을 사용하여 연속적으로 단계 희석한 시험물질(예, 1 nM ~ 1 mM)을 10 μ L씩 처리한다. 모든 웰의 용액은 최종 100 μ L로 한다.

- (2) 작용물질 측정시험에서는 작용반응의 양성 기준물질(PC_{AGO}, 10 nM DHT), 세포독성 양성 기준물질(PC_{CT}, 10 µg/mL cycloheximide) 및 용제(DMSO 등)를 처리한 군을 두어야 한다.
- (3) 길항물질 측정시험에서는 작용반응의 양성 기준물질(PC_{AGO}, 10 nM DHT), 길항물질 활성측정시험에서 작용반응을 유도하는 물질(AG_{ref}, 500 pM DHT), 길항작용의 양성 기준물질(PC_{ATG}, 500 pM DHT 및 1 µM HF), 세포독성 양성 기준물질(PC_{CT}, 10 µg/mL cycloheximide) 및 용제(DMSO 등)를 처리한 군을 두어야 한다.
- (4) 길항물질 측정시험에서는 용매 대조군, PC_{AGO} 및 PC_{ATG}를 제외한 모든 물질군에는 미리 배지에 녹인 AG_{ref}를 같이 처리한다(예, 56 nM DHT가 함유된 90 µL 배지에 시험물질 10 µL를 첨가할 경우 DHT의 최종 농도는 500 pM).
- (5) 기준물질 외에도 작용물질 및 길항물질에 대한 양성 및 음성 대조물질을 처리한 군을 두어야 한다.
- (6) 시험물질을 처리한 후에, 분석 플레이트를 37 °C ± 1 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 20 시간 ~ 24 시간 동안 배양한다.
- (7) 휘발성이 높은 시험물질은 인접한 웰에 유입될 수 있으므로 이 경우, 플레이트를 밀전함으로써 인접한 웰로 물질이 유입되는 것을 효과적으로 차단한다.
- (8) 시험물질 처리를 위한 분석 플레이트의 설계 예시는 부록 1에 있다.

4.7 루시퍼라제 분석

AR반응 측정을 위해서는 세포를 용해시킨 후 기질인 루시페린을 첨가하여 방출하는 발광량을 측정함으로써 웰 당 RLU를 표현한다. 판매용 이중 리포터 분석 시스템(예, Promega, E2920 또는 그 동등 상품)은 AR 반응(반딧불이 루시퍼라제 활성) 및 세포독성(레닐라 루시퍼라제 활성)을 동시에 검출하도록 설계되어 있으므로 각각의 활성을 측정한다. 분석 시약은 발광광도계의 민감도에 따라 적절히 선택한다.

III. 시험 결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 AR 작용물질

각 웰의 발광신호 값을 아래와 같이 처리한다.

- (1) 용매대조군(VC)의 RLU 평균값을 계산한다.

- (2) 각 웰의 값에서 용매대조군(VC)의 RLU 평균값을 빼서 용매간섭을 제거한 보정 값을 구한다.
- (3) 각 웰의 보정된 PC_{AGO} (10 nM DHT)의 RLU 평균값을 계산한다.
- (4) 각 웰의 보정값을 PC_{AGO} 평균값(100 %로 설정함)으로 나누어 각 웰의 상대 전사값(RTA, relative transcription activity)을 구한다.
- (5) 위 값으로부터 시험물질 각 농도군의 상대전사활성의 평균값을 구한다.
- (6) 작용물질의 경우, 각 시험물질에 대해 RPC_{max} , $\log PC_{10}$, $\log PC_{50}$ 에 대한 정보가 제시되어야 한다.

1.2 AR 길항물질

각 웰의 발광신호 값을 아래와 같이 처리한다.

- (1) 용매대조군(VC)의 RLU 평균값을 계산한다.
- (2) 각 웰의 값에서 용매대조군(VC)의 RLU 평균값을 빼서 용매간섭을 제거한 보정 값을 구한다.
- (3) 각 웰의 보정된 AG_{ref} (500 pM DHT)의 평균값을 계산한다.
- (4) 각 웰의 보정 값을 AG_{ref} 평균값(100 %로 설정함)으로 나누어 각 웰의 상대 전사값을 구한다.
- (5) 위 값으로부터 시험물질 각 농도군의 상대전사활성의 평균값을 구한다.
- (6) 길항물질의 경우, 각 시험물질의 전사활성 억제력에 대한 $\log IC_{30}$, $\log IC_{50}$ 의 정보가 제시되어야 한다.

2. 시험의 성립조건

2.1 허용기준

- (1) 숙련도 시험결과는 표 1-1, 표 1-2에 명시된 기준을 만족해야 한다.
- (2) 작용물질, 길항물질의 양성 및 음성 대조물질에 대한 시험결과는 표 2-1 및 표 2-2에 제시된 각각의 기준을 만족해야 한다.
- (3) $\log PC_x$ 또는 $\log IC_x$ 값을 계산하기 위해서는 최소 2 회 이상 시험할 필요가 있다. 3 개 웰의 시험결과 값의 변이계수는 20 % 미만이어야 한다(% CV < 20 %). (x는 AR활성에 대한 증가 또는 억제의 정량적 비율)

2.2 시험 자료의 판정

각 시험 방법에서 조정된 시험자료의 해석은 양성과 음성 반응을 분류하는데 사용한다. 허용기준에 적합하고, 2 회의 시험시행에서 재현성이 확인되었다면 3 차 시험을 수행할 필요는 없다. 2 회의 시험 시행에서 재현성이 없다면 적어도 3 회의 독립적인 시험을 수행하고 3 회 중 2 회에서 동일한 결과가 나올 경우 이에 근거하여 분류한다.

2.2.1 작용물질

- (1) 작용물질은 $\log PC_{50}$ 및 $\log PC_{10}$ 을 계산한다.
- (2) 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회의 시험 시행에서 RPC_{max} 가 양성 기준물질의 반응에 비해 10 % 이상인 경우 시험물질은 양성으로 판정한다. 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회의 시험시행에서 양성 기준물질 반응의 10 %를 달성하지 못하면 음성으로 판정한다.

2.2.2 길항물질

- (1) 길항물질은 $\log IC_{50}$ 및 $\log IC_{30}$ 을 계산한다.
- (2) 실시한 시험의 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회에서 시험물질의 $\log IC_{30}$ 가 계산될 수 있는 경우 양성으로 판정하며, 계산될 수 없는 경우에는 음성으로 판정한다.

3. 시험결과의 보고

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 대조군, 기준물질, 시험물질의 정보

- (1) 공급처, 로트 번호, 유효 기간
- (2) 시험물질 자체의 안정성
- (3) 용매에서의 용해도, 안정성
- (4) 배지 중 침전물 생성
- (5) 단일조성물질의 물질 자료(CAS 명, CAS 번호) 및 물리화학적 성질
- (6) 다조성물질 및 혼합물질의 물질 자료 및 물리화학적 성질

3.4 용매

- (1) 물질의 종류, 공급처, 로트 번호
- (2) 용매 선택의 기준
- (3) 용해도와 안정성(알려진 경우)

3.5 세포

- (1) 세포의 형태와 구입처
- (2) 세포 계대 수
- (3) 세포 배양의 유지 방법

3.6 시험조건

- (1) 용해도의 한계
- (2) CO₂ 농도와 배지 구성 성분
- (3) 시험물질의 농도
- (4) 첨가한 시험물질과 용매의 용량
- (5) 배양 온도 및 습도
- (6) 처리 기간
- (7) 처리 중 세포 밀도
- (8) 양성/음성 대조물질
- (9) 시험물질 노출 기간
- (10) 루시퍼라제 분석 시약(제품명, 공급처 및 로트)
- (11) 시험의 성립 조건, 자료의 해석기준

3.7 시험의 성립 조건

- (1) 각 분석 플레이트에 대한 유도 배율
- (2) logPC₅₀ 및 logPC₁₀(또는 logIC₅₀ 및 logIC₃₀) 값

3.8 시험 결과

- (1) 발광값(기초 자료 및 보정 값)
- (2) 최대 유도 배율

- (3) 세포독성 자료
- (4) 농도-반응 관계(해당 시)
- (5) 작용물질의 경우 $\log PC_{10}$, $\log PC_{50}$ 및 PC_{\max}
- (6) 길항물질의 경우 $\log IC_{50}$, $\log IC_{30}$
- (7) EC_{50} 값(적절한 경우)
- (8) 오류와 신뢰도를 측정한 통계적 분석 및 방법 설명
- (9) 판정기준에 따른 시험물질의 음성/양성 결과

3.9 시험 결과에 대한 고찰

3.10 결론

표 1-1. 작용물질 평가를 위한 숙련도 시험의 물질 및 기준

물질명	CAS 번호	분류	logPC ₁₀ (M)	logPC ₅₀ (M)	화학적 분류	제품 분류
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	양성	-12.08 ~ -9.87	-11.03 ~ -9.00	Steroid, nonphenolic	의약품
Mestanolone	521-11-9	양성	-10.92 ~ -10.41	-10.15 ~ -9.26	Steroid, nonphenolic	의약품
Testosterone	58-22-0	양성	-10.42 ~ -9.73	-9.46 ~ -8.96	Steroid, nonphenolic	의약품
17 β -Estradiol	50-28-2	양성	-7.74 ~ -6.75	-5.34 ~ -4.88	Steroid, phenolic	의약품
Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9	양성	-9.64 ~ -8.89	-8.77 ~ -8.37	Steroid, nonphenolic	의약품
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	음성	-		Phthalate	가소제
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	음성	-		Phthalate	화학 중간물; 가소제
Bisphenol A	80-05-7	음성	-		Bisphenol	화학 중간물

M: 몰농도(molar)

표 1-2. 길항물질 평가를 위한 숙련도 시험의 물질 및 기준

물질명	CAS 번호	분류	logIC ₃₀ (M)	logIC ₅₀ (M)	화학적 분류	제품 분류
Hydroxyflutamide	52806-53-8	양성	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	Anilide	의약품 대사체
Bisphenol A	80-05-7	양성	-7.52 ~ 4.48	-7.05 ~ -4.29	Bisphenol	화학 중간물
Flutamide	13311-84-7	양성	-6.20 ~ -5.69	-5.66 ~ -5.43	Anilide	의약품
Prochloraz	67747-09-5	양성	-5.77 ~ -5.47	-5.44 ~ -5.12	Imidazole	농약
Vinclozolin	50471-44-8	양성	-6.83 ~ -6.32	-6.47 ~ -5.85	Organochlorine	농약
Mestanolone	521-11-9	음성	-		Steroid, nonphenolic	의약품
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	음성	-		Phthalate	화학 중간물; 가소제
Atrazine	1912-24-9	음성	-		Triazine; Aromatic amine	가소제
6-Propyl-2-thiouracil	51-52-5	음성	-		Pyrimidines	의약품

M: 몰농도(molar)

표 2-1. AR 작용반응시험에서의 양성 및 음성 대조물질의 시험결과 및 기준

물질명 [CAS 번호]	판단	logPC ₁₀	logPC ₅₀	시험 범위
5 α -Dihydrotestosterone (DHT) [521-18-6]	양성: PC ₁₀ 을 계산해야 함	-12.08 ~ -9.87	-11.03 ~ -9.00	10 ⁻¹² M ~ 10 ⁻⁶ M
Mestanolone [521-11-9]	양성: PC ₁₀ 을 계산해야 함	-10.92 ~ -10.41	-10.15 ~ -9.26	10 ⁻¹² M ~ 10 ⁻⁶ M
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [117-81-7]	음성: PC ₁₀ 을 계산하지 않아도 됨	-	-	10 ⁻¹¹ M ~ 10 ⁻⁵ M

표 2-2. AR 길항반응시험에서의 양성 및 음성 대조물질의 시험결과 및 기준

물질명 [CAS 번호]	판단	logIC ₃₀	logIC ₅₀	시험 범위
Hydroxyflutamide (HF) [52806-53-8]	양성: IC ₃₀ 을 계산해야 함	-8.37 ~ -6.41	-7.80 ~ -6.17	10 ⁻¹⁰ M ~ 10 ⁻⁵ M
Bisphenol A(BPA) [80-05-7]	양성: IC ₃₀ 을 계산해야 함	-7.52 ~ -4.48	-7.05 ~ -4.29	10 ⁻¹⁰ M ~ 10 ⁻⁵ M
Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) [117-81-7]	음성: IC ₃₀ 을 계산하지 않아도 됨	-	-	10 ⁻¹⁰ M ~ 10 ⁻⁵ M

부록 1
분석 플레이트의 설계

1) 작용물질 측정시험에서 양성 및 음성 대조물질의 시험용 플레이트 구성

열	DHT			Mestanolone			DEHP			시험물질 [#]		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 μ M	→	→	1 mM	→	→
B	100 nM	→	→	100 nM	→	→	1 μ M	→	→	100 μ M	→	→
C	10 nM	→	→	10 nM	→	→	100 nM	→	→	10 μ M	→	→
D	1 nM	→	→	1 nM	→	→	10 nM	→	→	1 μ M	→	→
E	100 pM	→	→	100 pM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	1 pM	→	→	1 pM	→	→	10 pM	→	→	1 nM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO}: 양성 대조군(10 nM DHT);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(10 μ g/mL cycloheximide);

#: 시험물질의 농도는 예시임

2) 길항물질 측정시험에서 양성 및 음성 대조물질의 시험용 플레이트 구성

열	HF			Bisphenol A			DEHP			시험물질 [#]		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	1 mM	→	→
B	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	100 μ M	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 μ M	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 μ M	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	AG _{ref}	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO}	→	→	PC _{ATG}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO}: 양성 대조군(10 nM DHT);

AG_{ref}: AR 작용반응 기준물질(DMSO)

PC_{ATG}: 양성 AR 길항반응 대조군(1 μ M HF);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(10 μ g/mL cycloheximide);

* 회색의 웰은 500 pM DHT를 첨가한 것임

#: 시험물질의 농도는 예시임

3) 작용물질 측정시험에서 기준물질 및 시험물질의 플레이트 구성

열	시험물질 1			시험물질 2			시험물질 3			시험물질 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	농도 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	농도 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	농도 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	농도 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	농도 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	농도 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	농도 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO}: 양성 대조군(10 nM DHT);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(10 μ g/mL cycloheximide);

4) 길항물질 측정시험에서 기준물질 및 시험물질의 플레이트 구성

열	시험물질 1			시험물질 2			시험물질 3			시험물질 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	농도 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	농도 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	농도 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	농도 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	농도 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	농도 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→
G	AG _{ref}	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO}	→	→	PC _{ATG}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO}: 양성 대조군(10 nM DHT);

AG_{ref}: AR 작용반응 기준물질(DMSO)

PC_{ATG}: 양성 AR 길항반응 대조군(1 μ M HF);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(10 μ g/mL cycloheximide);

* 회색의 웰은 500 pM DHT를 첨가한 것임

#: 시험물질의 농도는 예시임

나. 22Rv1/MMTV_GR-KO세포를 이용한 안드로겐수용체 전사활성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 안드로겐수용체(AR, androgen receptor)의 전사활성을 측정함으로써 안드로겐 작용물질과 길항물질을 동정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 안드로겐 활성(androgen activity)

안드로겐수용체와의 결합을 활성화시키는 화학물질의 능력

2.2 작용물질(agonist)

안드로겐수용체에 결합하여 안드로겐과 유사한 생물학적 반응을 일으키는 물질

2.3 길항물질(antagonist)

스스로 생물학적 반응을 유발하지는 않으나 안드로겐수용체에 결합하여 작용물질의 반응을 차단 또는 감소시키는 물질

2.4 EC₅₀

최고반응의 50 %를 나타내는 작용물질의 농도

2.5 PC₅₀

작용물질 활성측정시험에서 양성 대조물질(10 nM DHT)에 의해 유도되는 반응의 50 %를 나타내는 시험물질의 농도

2.6 IC₃₀

길항물질 활성측정시험에서 800 pM DHT에 의해 유도되는 최대반응의 30 %를 저해하는 시험물질의 농도

2.7 PC_{AGO1}

작용반응의 양성 기준물질, 10 nM DHT

2.8 PC_{AGO2}

작용반응의 양성 기준물질, 800 pM DHT

2.9 PC_{ANTA}

길항반응의 양성 기준물질, 800 pM DHT, 1 μ M bicalutamide

2.10 PC_{CT}

세포독성 양성 기준물질, 1 mM SDS

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 세포주(22Rv1/MMTV_GR-KO)를 사용한 생체 외(*in vitro*) 시험법이며, 그 결과를 생체 내 (*in vivo*)의 반응과 직접 연관시킬 수는 없다. 또한 세포주의 대사능력에 한계가 있으므로 대사체보다는 주로 모화합물에 대한 영향을 나타낼 가능성이 크다. 루시퍼레이스 활성(luciferase activity)을 종말점(endpoint)으로 측정함으로써 인체 안드로젠수용체를 매개로 하는 작용물질과 길항물질을 탐색하도록 설계되었다. 단, 루시퍼레이스 활성을 방해하는 시험물질은 이 시험법에 적합하지 않으므로 제외한다.

2. 원리

- (1) 인체 전립선암세포주(22Rv1)에서 유래된 22Rv1/MMTV_GR-KO 세포주를 이용하는 시험법으로 내분비 활성화에 대한 화학물질을 스크리닝하기 위해 안정하게 형질전환된 전사활성화(TA) 분석법을 사용한다. 이 분석법은 루시퍼라제 활성을 측정하여 인간 AR 매개 전사활성화 및 억제를 확인할 수 있다.
- (2) 시험의 판정은 시험물질에 의해 유도되는 최대 반응 수준을 바탕으로 한다. 작용물질 스크리닝시험은 10 nM DHT에 의해 유도되는 반응의 10 % 이상일 경우 양성으로 판정하며, 길항물질 스크리닝시험은 800 pM DHT에 의해 유도된 반응을 30 % 이상 억제 하였을 경우와 특이성대조시험에서 R^2 값이 0.9 미만인 경우의 두 기준을 만족한다면 양성으로 판정한다.

3. 시험의 준비

3.1 실험실 숙련도 시험

- (1) AR 작용물질(8 종, 표 1-1)과 길항물질(9 종, 표 1-2)을 사용하여 숙련도 시험을 실시한다.
- (2) 숙련도 시험은 최소한 2 회 이상 실시하되, 서로 다른 날에 실시한다.
- (3) 숙련도 시험결과는 표 2-1과 표 2-2에서 제시된 각각의 숙련도 기준 ($\log PC_{10}$, $\log PC_{50}$ 의 농도범위)에 적합해야 한다.

3.2 세포주

- (1) 안정적으로 형질 전환된 22Rv1/MMTV_GR-KO 세포주를 사용한다.
- (2) 마이코플라스마에 오염되지 않은 세포만을 사용한다.

3.3 세포의 안정성

- (1) 시험에 사용하는 세포주 반응의 안정성을 유지하려면 세포를 -80°C 미만으로 유지해야 한다(냉동고 또는 액체질소).
- (2) 세포는 해동 후 최소한 두 번 이상 계대배양한 후 화학물질의 (항)안드로겐 활성 평가에 사용한다.
- (3) AR 작용물질의 분석시험에 사용할 세포주의 안정성을 모니터링하기 위해서는 DHT 및 mestanolone를 양성 대조물질로, diethylhexyl phthalate (DEHP)를 음성 대조물질로 사용한다. 3 종 기준물질에 대한 농도반응 곡선을 매 시험마다 최소 1 회 측정하며 시험결과는 표 2-1에 제시된 기준을 만족해야 한다.
- (4) AR 길항작용을 측정하기 위한 세포주의 안정성을 모니터링하기 위해서는 bicalutamide 및 bisphenol A (BPA)를 양성 대조물질로, DEHP를 음성 대조물질로 사용한다. 3 종 기준물질에 대한 농도반응 곡선을 매 시험마다 최소 1 회 측정하며 시험결과는 표 2-2에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4. 시험 방법

4.1 세포의 배양

- (1) 세포주 구입처가 제공하는 프로토콜에 따라 세포주를 배양하며, 세포 반응의 적정성을 유지하기 위해서 30 회 이상 계대 배양하지 않는다.
- (2) 3×10^5 세포/mL의 밀도로 조정된 세포액을 96-웰 플레이트에 웰당 100 μL (3

$\times 10^4$ 세포)씩을 취하여 분주한다. 세포는 시험물질 노출 전에 $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 5 % CO_2 배양기에서 48 시간 동안 미리 배양해야 한다.

4.2 용매

시험물질은 적절한 용매에 잘 녹을 수 있고, 세포의 배지와 쉽게 섞일 수 있어야 한다. 시험물질의 용매 및 용제로는 dimethyl sulfoxide (DMSO)를 사용하며 배지 중 최종농도는 0.1 % (v/v)를 넘지 않아야 한다. 용매 및 용제는 최고농도에서 세포독성을 나타내지 않으며 시험의 과정에 간섭하지 않아야 한다.

4.3 기준물질과 양성/음성 대조물질

4.3.1 작용물질 시험에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 5α -dihydrotestosterone (DHT)와 mestanolone을 사용한다.
- (2) 음성 대조물질로는 diethylhexyl phthalate (DEHP)를 사용한다.
- (3) 작용물질 활성측정시험에 사용하는 양성 기준물질(PC_{AGO1})은 10 nM DHT를 사용한다.
- (4) 세포독성 대조물질(PC_{CT})은 1 mM SDS를 사용하며 각 기준물질과 대조물질은 매 시험시 플레이트마다 포함되어야 한다.
- (5) PC_{AGO1} RLU (relative light unit, 상대발광단위) 평균값을 용매대조군(VC, vehicle control)의 RLU 평균값으로 나눈 유도 배율은 13 이상이어야 하며 PC_{10} 에서의 유도 배율은 용매대조군 유도 배율의 $1 + 2\text{ SD}$ (편차) 값보다 커야 한다.
- (6) 양성 및 음성 대조물질의 시험결과는 표 2-1에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4.3.2 길항물질 시험에서의 기준물질과 대조물질

- (1) 양성 대조물질로는 bicalutamide와 bisphenol A (BPA)를 사용한다.
- (2) 음성 대조물질로는 DEHP를 사용한다.
- (3) 길항물질 활성측정시험에 사용하는 양성 기준물질(PC_{AGO2})은 800 pM DHT를 사용한다.
- (4) 길항반응의 양성 기준물질(PC_{ANTA})은 800 pM DHT 및 1 μM bicalutamide를 사용하며 각 기준물질과 대조물질은 매 시험시 플레이트마다 포함되어야 한다.
- (5) 최대 RLU 평균값을 용매대조군의 RLU 평균값으로 나눌 때의 유도 배율은 10 이상이어야 한다. 용매대조군 RLU로 보정한 PC_{ANTA} RLU의 평균값은 용매

대조군 RLU로 보정한 PC_{AGO2}의 RLU 평균값에 비해 53.6 % 이하여야 한다.

(6) 양성 및 음성 대조물질의 시험결과는 표 2-2에 제시된 기준을 만족해야 한다.

4.4 농도범위 설정을 위한 용해도

(1) 시험물질의 최대 농도를 결정하기 위해 용해도 시험을 수행한다.

(2) 시험물질은 적절한 용제(DMSO 또는 적절한 용매)에 최대 1M(저장용액)로 준비한다. 침전이 발생하면 침전이 관찰되지 않을 때까지 10배 낮은 새 용액으로 다시 준비해야 한다.

4.5 시험물질의 노출 및 사전시험(pre-screen run)

(1) 48 시간동안 배양한 세포에 용해도 시험을 거쳐 결정된 각 시험물질의 저장 용액을 1:10비율로 단계 희석한 후(예, 1 nM ~ 1 mM) 적정시험농도에 사용한다. 시험농도는 농도별 3 개 웰을 사용하여 처리하고 모든 웰의 용액은 최종 100 μ L로 한다. DMSO의 배지 중 최종농도는 0.1 %로 한다.

(2) 작용물질 측정시험에서는 작용반응의 양성 기준물질(PC_{AGO1}, 10 nM DHT), 세포독성 양성 기준물질(PC_{CT}, 10 mM SDS) 및 용매(VC) 0.1 % DMSO를 처리한 군을 두어야 한다.

(3) 길항물질 측정시험에서는 작용반응의 양성 기준물질(PC_{AGO2}, 800 pM DHT), 길항작용의 양성 기준물질(PC_{ANTA}, 800 pM DHT 및 1 μ M Bicalutamide), 세포독성 양성 기준물질(PC_{CT}, 1 mM SDS) 및 용매(VC) 0.1 % DMSO를 처리한 군을 두어야 한다. VC군을 제외하고 다른 모든 웰에는 작용 반응 감소를 측정하기 위해 작용 기준물질(800 pM DHT)을 고정농도로 처리한다.

(4) 시험물질을 처리한 후에, 분석 플레이트를 37 $^{\circ}$ C \pm 1 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂ 배양기에서 20 시간 ~ 24 시간 동안 배양한다.

(5) 휘발성이 높은 시험물질은 인접한 웰에 유입될 수 있으므로 이 경우, 플레이트를 밀전함으로써 인접한 웰로 물질이 유입되는 것을 효과적으로 차단한다.

(6) 시험물질 처리를 위한 분석 플레이트의 설계 예시는 부록 1에 있다.

4.6 종합시험(comprehensive run) 및 특이성대조시험(specificity control test)

(1) 작용물질/길항물질 사전시험에서 양성반응으로 결정된 시험물질은 종합시험을 추가로 수행해야 한다. 사전시험에서 용량 반응 곡선을 통해 결정된 최대 농도의

시험물질을 DMSO(최종농도 0.1 %)에 1:3 또는 1:5 비율로 단계희석 한다.

(2) 기준물질과 플레이트 구성은 사전시험과 동일하며, 모든 시험은 용량반응 곡선이 잘 나타나는 농도로 수행하고 용해되지 않거나 세포독성을 보이는 농도는 제외한다.

(3) 시험물질을 처리한 후에, 분석 플레이트를 37 °C ± 1 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 20 시간 ~ 24 시간 동안 배양한다.

(4) 길항반응시험에서 판정을 명확하게 하기 위하여 특이성대조시험을 진행하며 플레이트 구성은 표 5와 같다. 참길항물질의 경우 두 농도의 시험물질에 대한 용량반응곡선 R² 값이 0.9 미만이어야 하며, 이를 통해 거짓길항물질(false antagonist) 및 참길항물질(true antagonist)을 구분할 수 있다.

4.7 세포독성 분석

(1) 세포독성 시험 분석 시험은 세포 생존력 프로테아제 검출 시약(예: Cell Titer-Fluor™ 세포 생존력 분석, Promega, G6080 또는 그 동등 상품)을 사용하여 측정한다. 세포 생존력 및 루시페라제 활성의 측정은 동일한 플레이트에서 수행된다.

(2) 제조업체의 프로토콜에 따라 세포생존력 시약을 준비하여 시험물질이 처리되어있는 웰에 20 µl 씩 추가한다. 시약을 처리한 후 37 °C ± 1 °C, 5 % CO₂ 배양기에서 1 ~ 3 시간 동안 배양한다. 반응이 끝난 플레이트를 형광측정기(380-400 nm Ex /505 nm Em)로 세포독성을 측정한다.

4.8 AR 전사활성(루시페라제 분석)

(1) 세포독성 측정이 끝난 분석 플레이트에 AR 전사활성반응 측정을 위한 루시페라제 분석 시약(예: Promega, E2510 또는 그 동등 상품)을 첨가하여 발광량을 측정한다. 세포 생존력 및 루시페라제 활성의 측정은 동일한 플레이트에서 수행된다.

(2) 제조업체의 프로토콜에 따라 루시페라제 분석 시약을 준비하고 세포측정이 끝난 분석 플레이트 웰에 50 µl 씩 추가한다. 빛을 차단시키고 5 ~ 10 분 동안 상온에서 반응시킨다. 반응이 끝난 플레이트를 발광 측정기로 루시페라제 활성을 측정한다.

Ⅲ. 시험 결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 세포독성

(1) RFU (relative fluorescence unit, 상대형광단위)로 읽혀진 세포독성은 작용반응 양성대조군(PC_{AGO1})의 평균값과 길항반응 양성대조군(PC_{AGO2})의 평균값을 100 %로 설정하고, 세포독성 대조군(PC_{CT})의 평균 값은 0 %로 설정한다.

(2) 세포독성 시험 결과에서 세포생존력이 20 % 이상 감소하는 시험물질의 농도는 세포독성이 있는 것으로 간주하며, 세포독성을 보이는 시험물질의 농도는 결과 분석에서 제외한다.

1.2 AR 전사활성(루시퍼라제 활성)

발광광도계에 의해 RLU 단위로 읽혀진 루시퍼라제 활성은 작용반응 양성대조군(PC_{AGO1})의 평균값과 길항반응 양성대조군(PC_{AGO2})의 평균값을 100 %로 설정하고, 용매대조군(VC)의 평균값은 0 %로 설정한다.

1.3 특이성대조시험

(1) Y_c(표준반응)는 800 pM DHT를 처리했을 때 c 농도에서 상대적인 유도를 나타내고, S_c(특정반응)는 100 nM DHT를 처리했을 때 c농도에서의 상대적인 유도를 나타낸다.

(2) 참길항물질인 시험물질의 결정 계수(square of the coefficient of determination, R²)는 표준반응 Y_c와 특정 반응 S_c로 계산된다. 만약 R²값이 0.9 미만이면 이 시험물질은 참길항물질로 판정한다(부록 1).

2. 시험의 성립조건

2.1 허용기준

(1) 숙련도 시험결과는 표 1-1, 표 1-2에 명시된 기준을 만족해야 한다.

(2) 작용물질, 길항물질의 양성 및 음성 대조물질에 대한 시험결과는 표 2-1 및 표 2-2에 제시된 각각의 기준을 만족해야 한다.

2.2 시험자료의 판정

각 시험방법에서 조정된 시험자료의 해석은 양성과 음성 반응을 분류하는데

사용한다. 허용기준에 적합하고, 2 회의 시험시행에서 재현성이 확인되었다면 3 차 시험을 수행할 필요는 없다. 2 회의 시험 시행에서 재현성이 없다면 적어도 3 회의 독립적인 시험을 수행하고 3 회 중 2 회에서 동일한 결과가 나올 경우에 근거하여 분류한다. 길항반응 시험에서는 추가적으로 양성의 경우, 시험 물질이 참 길항물질로 판단하기 위해서는 특이성 대조시험에서 시험물질의 R^2 값이 0.9 미만이어야 한다.

2.2.1 작용물질

- (1) 작용물질은 OECD 공식 웹사이트의 시험 지침에서 이용할 수 있는 스프레드시트를 이용하여 $\log PC_{50}$ 및 $\log PC_{10}$ 을 계산한다.
- (2) 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회의 시험 시행에서 RPC_{max} 가 양성 기준물질의 반응에 비해 10 % 이상인 경우 시험물질은 양성으로 판정한다. 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회의 시험시행에서 양성 기준물질 반응의 10 %를 달성하지 못하면 음성으로 판정한다.

2.2.2 길항물질

- (1) 길항물질은 공식 웹사이트의 시험 지침에서 이용할 수 있는 스프레드시트를 이용하여 $\log IC_{50}$ 및 $\log IC_{30}$ 을 계산한다.
- (2) 실시한 시험의 3 회 중 2 회 또는 2 회 중 2 회에서 시험물질의 $\log IC_{30}$ 가 계산될 수 있는 경우 및 특이성 대조시험(specificity control test)에서 R^2 값이 0.9 미만일 경우 양성으로 판정하며, 스프레드시트 계산값이 산출되지 않는 경우에는 음성으로 판정한다.

3. 시험결과의 보고

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 대조군, 기준물질, 시험물질의 정보

- (1) 공급처, 로트 번호, 유효 기간
- (2) 시험물질 자체의 안정성

- (3) 용매에서의 용해도, 안정성
- (4) 배지 중 침전물 생성
- (5) 단일조성물질의 물질 자료(CAS 명, CAS 번호) 및 물리화학적 성질
- (6) 다조성물질 및 혼합물질의 물질 자료 및 물리화학적 성질

3.4 용매

- (1) 물질의 종류, 공급처, 로트 번호
- (2) 용매 선택의 기준
- (3) 용해도와 안정성(알려진 경우)

3.5 세포

- (1) 세포의 형태와 구입처
- (2) 세포 계대 수
- (3) 세포 배양의 유지 방법

3.6 시험조건

- (1) 용해도의 한계
- (2) CO₂ 농도와 배지 구성 성분
- (3) 시험물질의 농도
- (4) 첨가한 시험물질과 용매의 용량
- (5) 배양 온도 및 습도
- (6) 처리 기간
- (7) 처리 중 세포 밀도
- (8) 양성/음성 대조물질
- (9) 시험물질 노출 기간
- (10) 루시퍼라제 분석 시약(제품명, 공급처 및 로트)
- (11) 시험의 성립조건, 자료의 해석기준

3.7 시험의 성립 조건

- (1) 각 분석 플레이트에 대한 유도 배율
- (2) logPC₅₀ 및 logPC₁₀(또는 logIC₅₀ 및 logIC₃₀)값

3.8 시험 결과

- (1) 발광값(기초 자료 및 보정 값)
- (2) 최대 유도 배율
- (3) 세포독성 자료
- (4) 농도-반응 관계(해당 시)
- (5) 작용물질의 경우 $\log PC_{10}$, $\log PC_{50}$
- (6) 길항물질의 경우 $\log IC_{50}$, $\log IC_{30}$
- (7) 특이성 대조의 경우 R^2
- (8) 오류와 신뢰도를 측정한 통계적 분석 및 방법 설명
- (9) 판정 기준에 따른 시험물질의 음성/양성 결과

3.9 시험 결과에 대한 고찰

3.10 결론

표 1-1. 작용물질 평가를 위한 숙련도 시험의 물질 및 기준

물질명	CAS 번호	분류	logPC ₁₀ (M)	logPC ₅₀ (M)	화학적 분류	제품 분류
5 α -Dihydrotestosterone	521-18-6	양성	-10.60 ~ -9.83	-9.73 ~ -8.95	Steroid, nonphenolic	의약품
Mestanolone	521-11-9	양성	-10.36 ~ -9.66	-9.65 ~ -8.39	Steroid, nonphenolic	의약품
Testosterone	58-22-0	양성	-10.28 ~ -9.91	-9.67 ~ -8.66	Steroid, nonphenolic	의약품
17 β -Estradiol	50-28-2	양성	-8.76 ~ -8.49	-7.19 ~ -6.03	Steroid, phenolic	의약품
Medroxyprogesterone 17-acetate	71-58-9	양성	-8.77 ~ -8.20	-7.64 ~ -6.01	Steroid, nonphenolic	의약품
Butylbenzyl phthalate	85-68-7	음성	-		Phthalate	가소제
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	음성	-		Phthalate	화학 중간물; 가소제
Bisphenol A	80-05-7	음성	-		Bisphenol	화학 중간물

M: 몰농도(molar)

표 1-2. 길항물질 평가를 위한 숙련도 시험의 물질 및 기준

물질명	CAS 번호	분류	logIC ₃₀ (M)	logIC ₅₀ (M)	화학적 분류	제품 분류
Hydroxyflutamide	52806-53-8	양성	-8.17 ~ -7.45	-7.79 ~ -7.11	Anilide	의약품 대사체
Bisphenol A	80-05-7	양성	-5.92 ~ -5.56	-5.68 ~ -5.29	Bisphenol	화학 중간물
Flutamide	13311-84-7	양성	-7.11 ~ -6.62	-6.70 ~ -6.26	Anilide	의약품
Prochloraz	67747-09-5	양성	-6.02 ~ -5.30	-5.47 ~ -4.95	Imidazole	농약
Vinclozolin	50471-44-8	양성	-7.22 ~ -6.74	-6.94 ~ -6.44	Organochlorine	농약
Mestanolone	521-11-9	음성	-		Steroid, nonphenolic	의약품
Di(2-ethylhexyl)phthalate	117-81-7	음성	-		Phthalate	화학 중간물; 가소제
Atrazine	1912-24-9	음성	-		Triazine; Aromatic amine	가소제
6-Propyl-2-thiouracil	51-52-5	음성	-		Pyrimidines	의약품

M: 몰농도(molar)

표 2-1. AR 작용반응시험에서의 양성 및 음성 대조물질의 시험결과 및 기준

물질명	logPC ₁₀	logPC ₅₀	시험 범위
5 α -Dihydrotestosterone (DHT)	-12.2 ~ -9.7	-10.6 ~ -9.0	10 ⁻¹² M ~ 10 ⁻⁶ M
Mestanolone	-12.3 ~ -9.8	-10.2 ~ -8.6	10 ⁻¹² M ~ 10 ⁻⁶ M
Diethylhexyl phthalate (DEHP)	-	-	10 ⁻¹¹ M ~ 10 ⁻⁵ M

표 2-2. AR 길항반응시험에서의 양성 및 음성 대조물질의 시험결과 및 기준

물질명	logIC ₃₀	logIC ₅₀	시험 범위
Bicalutamide	-7.5 ~ -6.2	-7.0 ~ -5.8	10 ⁻¹⁰ M ~ 10 ⁻⁴ M
Bisphenol A (BPA)	-6.6 ~ -5.4	-6.2 ~ -5.0	10 ⁻¹¹ M ~ 10 ⁻⁵ M
Diethylhexyl phthalate (DEHP)	-	-	10 ⁻¹¹ M ~ 10 ⁻⁵ M

부록 1
분석 플레이트의 설계

1) 작용물질 측정시험에서 양성 및 음성 대조물질의 시험용 플레이트 구성

열	DHT			Mestanolone			DEHP			시험물질#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	10 μ M	→	→	1 mM	→	→
B	100 nM	→	→	100 nM	→	→	1 μ M	→	→	100 μ M	→	→
C	10 nM	→	→	10 nM	→	→	100 nM	→	→	10 μ M	→	→
D	1 nM	→	→	1 nM	→	→	10 nM	→	→	1 μ M	→	→
E	100 pM	→	→	100 pM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	1 pM	→	→	1 pM	→	→	10 pM	→	→	1 nM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO1}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO1}: 양성 대조군(10 nM DHT);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(1 mM SDS);

#: 시험물질의 농도는 예시임

2) 길항물질 측정시험에서 양성 및 음성 대조물질의 시험용 플레이트 구성

열	Bicalutamide			Bisphenol A			DEHP			시험물질#		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	1 mM	→	→
B	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	100 μ M	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 μ M	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 μ M	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
G	10 pM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO2}	→	→	PC _{ANTA}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO2}: 양성 대조군(800 pM DHT);

PC_{ANTA}: 양성 AR 길항반응 대조군(1 μ M Bicalutamide);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(1 mM SDS);

* : 800 pM DHT를 첨가한 것임

#: 시험물질의 농도는 예시임

3) 작용물질 측정시험에서 기준물질 및 시험물질의 플레이트 구성

열	시험물질 1			시험물질 2			시험물질 3			시험물질 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	농도 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	농도 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	농도 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	농도 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	농도 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	농도 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	0.1 pM	→	→
G	농도 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	→	PC _{AGO}	→	→	→	PC _{CT}	→	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO1}: 양성 대조군(10 nM DHT);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(1 mM SDS);

4) 길항물질 측정시험에서 기준물질 및 시험물질의 플레이트 구성

열	시험물질 1			시험물질 2			시험물질 3			시험물질 4		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	농도 1 (10 μ M)	→	→	1 mM	→	→	1 μ M	→	→	10 nM	→	→
B	농도 2 (1 μ M)	→	→	100 μ M	→	→	100 nM	→	→	1 nM	→	→
C	농도 3 (100 nM)	→	→	10 μ M	→	→	10 nM	→	→	100 pM	→	→
D	농도 4 (10 nM)	→	→	1 μ M	→	→	1 nM	→	→	10 pM	→	→
E	농도 5 (1 nM)	→	→	100 nM	→	→	100 pM	→	→	1 pM	→	→
F	농도 6 (100 pM)	→	→	10 nM	→	→	10 pM	→	→	100 pM	→	→
G	농도 7 (10 pM)	→	→	1 nM	→	→	1 pM	→	→	0.01 pM	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO2}	→	→	PC _{ANTA}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO2}: 양성 대조군(800 pM DHT);

PC_{ANTA}: 양성 AR 길항반응 대조군(1 μ M Bicalutamide);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(1 mM SDS);

* : 800 pM DHT를 첨가한 것임

5) 길항물질 측정시험에서 시험물질의 특이성 대조시험(specificity control test)을 위한 플레이트 구성

열	시험물질 1						시험물질 2					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→	1 mM	→	→	1 mM	→	→
B	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→	100 μ M	→	→	100 μ M	→	→
C	100 nM	→	→	100 nM	→	→	10 μ M	→	→	10 μ M	→	→
D	10 nM	→	→	10 nM	→	→	1 μ M	→	→	1 μ M	→	→
E	1 nM	→	→	1 nM	→	→	100 nM	→	→	100 nM	→	→
F	100 pM	→	→	100 pM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
G	10 pM	→	→	10 pM	→	→	10 nM	→	→	10 nM	→	→
H	VC	→	→	PC _{AGO2}	→	→	PC _{ANTA}	→	→	PC _{CT}	→	→

VC: 용매 대조군(0.1 % DMSO);

PC_{AGO2}: 양성 대조군(800 pM DHT);

PC_{ANTA}: 양성 AR 길항반응 대조군(1 μ M Bicalutamide);

PC_{CT}: 세포독성 대조군(1 mM SDS);

* : 800 pM DHT를 첨가한 것임

* : 100 nM DHT를 첨가한 것임

제62항 유전독성시험(티미딘 키나제 유전자 돌연변이시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 마우스 림프종 세포주(L5178Y) 또는 인간 림프아구성 세포주(TK6)를 사용하여 내인성 티미딘 키나제 유전자(TK, thymidine kinase)의 전방 돌연변이를 측정함으로써, 시험물질의 유전자 돌연변이 유발 가능성을 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 유전독성

DNA 파손, 부가물, 재배치, 돌연변이, 염색체 이상 및 이수성을 포함한 모든 유형의 DNA 또는 염색체 손상을 포괄하는 일반적인 용어

2.2 돌연변이원성

유전자 또는 염색체 DNA 염기 서열의 유전 가능한 변화

2.3 돌연변이 빈도(MF, mutant frequency)

생존 세포 수 대비 관찰된 돌연변이 세포 수의 비율

2.4 클로닝 효율(CE, cloning efficiency)

배양접시에 저밀도로 분주된 세포 수 대비 계수 가능한 콜로니의 생성비율

2.5 상대 생존율(RS, relative survival)

TK6 세포주에서 시험물질 처리에 의해 나타나는 세포독성의 척도로서 음성 대조군의 클로닝 효율대비 시험물질 투여군의 클로닝 효율의 비

2.6 상대 총 성장률(RTG, relative total growth)

L5178Y 세포주에서 시험물질 처리에 의해 나타나는 세포독성의 척도. 시험물질 투여군의 투여 2 일간 및 돌연변이체 클로닝 기간 동안의 성장과 동일 기간의 음성 용매 대조군의 성장에 대한 상대 비율

2.7 S9

간 균질액을 9,000 g에서 원심분리하였을 때 생성되는 상층액

2.8 대사활성계(S9 mix)

S9과 대사 효소 활성화에 필요한 보조인자들의 혼합물질

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 생체 외(*in vitro*) 시험법으로서 필요에 따라 외인성 대사활성계(S9 mix)를 사용한다. 그러나 외인성 대사활성계를 시험에 사용하여도 생체 내(*in vivo*) 대사활성계를 완전히 구현하는 것은 아니므로 시험결과를 해석할 때는 이를 감안하여야 한다. pH 또는 삼투압의 변화, 배지 성분과의 상호작용 및 세포 독성 등 과도한 시험 조건으로 인해 위양성 결과가 나타날 수 있으므로 이러한 조건은 피하도록 한다. 염색체 이상 유도 분석은 시험물질 처리 세포와 미처리 세포 모두에서 유사분열에 도달한 중기세포를 사용하여야 한다.

2. 원리

마우스 림프종 세포주 또는 인간 림프아구성 세포주에 함유된 내인성 TK^{+/+} 유전자가 시험물질에 의해 TK^{-/-}로 돌연변이 될 경우 배지 중에 함유된 trifluorothymidine(TFT)에 의한 세포독성이 나타나지 않아 지속적으로 증식하며 콜로니를 생성한다. 반면에, 돌연변이가 일어나지 않아 TK^{+/+} 유전자가 유지되는 세포주는 TFT에 의한 독성으로 인해 증식할 수 없다. 따라서 증식하는 세포주의 콜로니를 확인함으로써 시험물질의 돌연변이 유무를 평가할 수 있다.

3. 시험의 준비

3.1 세포 및 배양

- (1) 마우스 림프종 세포주인 L5178Y와 인간의 림프아구성 세포주인 TK6를 사용하며 시험 전에 핵형을 확인하거나, TK 유전자좌를 가진 염색체를 염색하거나 세포의 배가시간(doubling time)을 확인해 보는 것이 좋다.
- (2) 세포는 적절한 습도와 5 % CO₂ 및 37 °C가 유지되는 배양기에서 배양한다. 세포배양은 대수증식기로 유지되어야 하며, 최적 성장을 보장하는 배지(예, RPMI) 및 배양조건을 선택하는 것이 중요하다.

- (3) L5178Y 및 TK6 세포주는 내인성 대사 능력이 충분하지 않으므로 대사활성에 의해 돌연변이를 일으키는 물질의 확인시험을 위해서는 외인성 대사활성계(S9 mix)를 시험계에 포함시켜야 한다. 외인성 대사활성계는 aroclor 1254 또는 phenobarbital/ β -naphthoflavone을 처리한 랫드의 간으로부터 얻은 S9 분획을 사용한다.

3.2 시험물질의 조제

- (1) 고체 시험물질은 적절한 용매에 용해시켜 사용하며 필요 시 희석하여 처리한다.
- (2) 액체 시험물질은 시험계에 직접 처리하거나 희석하여 사용한다.
- (3) 기체 또는 휘발성 시험물질은 밀봉된 배양 용기에서의 물질처리에 대한 표준 프로토콜에 준하여 시험한다.
- (4) 시험물질의 안정성에 대한 보관기간이 설정되어 있지 않는 한 시험물질은 노출 직전에 조제한다.

3.3 대조물질의 조제

- (1) 모든 실험에는 음성 용매 대조군과 양성 대조군을 포함하여야 한다. 양성 대조물질은 대사활성이 필요한 것과 필요하지 않은 것 등 2 개 분류가 있으며 각각의 물질은 표 1에 제시되어 있다. 타당한 근거가 있을 경우 다른 물질을 양성 대조물질로 사용할 수도 있다.
- (2) 시험물질을 3 시간 ~ 4 시간 동안 단기간 노출시키는 경우에는 대사활성이 필요한 돌연변이 물질만을 양성 대조물질로 사용할 수 있다. 그러나 시험물질을 24 시간 정도 장기간 노출시키는 경우에는 대사활성이 필요한 돌연변이 물질뿐만 아니라 대사활성이 필요하지 않은 돌연변이 물질에 대해서도 그에 맞는 양성 대조물질로 사용하여야 한다.

3.4 숙련도 시험

- (1) 본 지침에 따른 시험을 수행하는 실험실은 시험 전에 이미 충분한 숙련도가 있음을 입증하여야 한다. 이를 위해서 음성 대조물질(용매 등) 및 표 1에 제시된 양성 대조물질을 사용한 실험을 수행하고 그 결과가 기존의 알려진 정보와 일치하는 지 확인하여야 한다. 양성 대조물질은 대사활성계가 필요한 물질과 필요하지 않은 물질 중에서 각각 한 개씩 선정하여 수행한다.

- (2) 음성 대조물질 및 양성 대조물질에 대해 이미 충분한 시험을 수행한 바 있고 그 결과가 적절한 경우에는 숙련도 확인을 위한 시험을 따로 수행할 필요는 없다.

4. 시험조건

4.1 용매

용매는 가능한 수용성 액체나 배양 배지를 사용한다. 물에 녹지 않은 시험물질의 경우 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 사용한다. 일반적으로 배지 중 DMSO의 최종농도는 1 %를, 수용성 액체를 용매로 사용하는 경우에는 10 %를 초과하지 않아야 한다.

4.2 세포독성 및 시험물질 농도

- (1) L5178Y 세포주의 경우 세포 독성은 상대 총 성장률(RTG)로써 평가하며 TK6 세포주의 경우에는 상대 생존율(RS)로써 평가한다.
- (2) 시험물질의 최고 농도는 과도한 세포독성 및 배지 중에서의 침전이 나타나지 않는 농도이어야 하며 pH 또는 삼투압의 현저한 변화와 같은 인위적인 양성 반응이 나타나는 농도는 피해야한다.
- (3) 시험물질은 음성/양성 대조군을 제외하고 최소 4 개 농도를 시험하며 세포독성이 나타나지 않는 경우 2 배수 ~ 3 배수의 농도간격을 둔다. 세포독성이 나타나는 시험물질의 경우에는 세포독성을 보이는 농도, 중간정도의 세포독성을 보이는 농도, 세포독성이 나타나거나 거의 또는 전혀 나타나지 않은 농도 범위를 포함하여야 한다.
- (4) 최고 농도가 세포독성에 근거하여 선정된 경우에 최고 농도는 L5178Y 세포주의 경우에는 상대 총 성장률이 10 % ~ 20 %, TK6의 경우에는 상대 생존율이 10 % ~ 20 %의 범위에 있어야 한다.
- (5) 난용성 물질의 경우 최고 농도는 시험물질의 처리가 끝났을 때 혼탁한 상태 또는 눈이나 현미경을 통해 볼 수 있는 침전물이 나타나는 농도로 한다.
- (6) 침전물 생성되지 않거나, 허용범위 수준의 세포독성만이 관찰되는 시험물질의 경우 최고 농도는 10 mM, 2 mg/mL 또는 2 μ l/mL 중 가장 낮은 값으로 한다. 성분이 명확하지 않은 시험물질의 경우 최고 농도는 5 mg/mL로 할 수 있다.

5. 시험 방법

5.1 시험물질 처리

- (1) 시험물질은 세포주가 증식하는 동안에 처리하며, 이때 S9 mix를 첨가하는 경우와 첨가하지 않은 경우 모두에 대해 실시한다. 시험물질 노출시간은 일반적으로 3 시간 ~ 4 시간이 적절하며 L5178Y 세포주의 경우, 특정 시험물질(예, 단기 노출 시 음성, 뉴클레오사이드 유사체, 난용성 물질 등)에 대해서는 24 시간 노출시킬 필요가 있다.
- (2) 시험의 모든 단계(처리, 표현형 발현 및 돌연변이 선별)에서 적어도 10 개 이상, 이상적으로는 100 개의 자발적 돌연변이를 유지하도록 각 실험 배양에서 충분한 세포를 처리하고 계대 배양한다.
- (3) 이를 위해 L5178Y 세포주의 경우 적어도 6×10^6 개의 세포를, TK6 세포주의 경우 적어도 20×10^6 개의 세포를 처리한다.

5.2 표현형 발현 시간, 세포독성 및 돌연변이 빈도 측정

- (1) 시험물질 노출기간이 종료된 후, 돌연변이체의 표현형 발현을 위해 세포를 일정기간 동안 배양한다. L5178Y 세포주의 경우 표현형 발현 기간은 2 일이며, TK6 세포주의 경우 표현형 발현 기간은 3 일 ~ 4 일이다.
- (2) 표현형 발현 기간 동안에는 매일 세포의 수를 측정한다. 표현형의 발현 기간이 종료되면 세포를 TFT를 첨가한 배지와 첨가하지 않은 배지로 구분하여 분주하고 배양한다.
- (3) L5178Y 세포주의 경우 10 일 ~ 12 일간 후속 배양 후 계수하며, TK6 세포주의 경우 조기에 나타나는 돌연변이 개체(초기 출현 돌연변이체)는 10 일 ~ 14 일간 후속 배양 후 계수하고 느리게 나타나는 돌연변이 개체(후기 출현 돌연변이체)에 대해서는 후속 배양 10 일 ~ 14 일 후 배지(및 TFT)를 교체하고 추가로 7일 ~ 10 일간 더 후속배양한 후에 계수한다.
- (4) TFT를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 세포독성을 평가하고 이를 바탕으로 돌연변이 빈도를 측정한다.

5.3 돌연변이체 콜로니 분석

- (1) 각 시험의 양성 대조군에서 양성 반응이 나타나지 않을 경우, 시험물질을 음성으로 판정할 수 없다.

- (2) L5178Y 세포주 시험에서 시험물질이 양성으로 판정되는 경우에는 콜로니 크기 또는 성장에 따른 특성 분석을 수행한다(양성 농도 중 하나, 음성 및 양성 대조군에 대해 실시). 시험물질이 음성으로 판정되는 경우에는 음성 및 양성 대조군에서 돌연변이 콜로니 분석을 수행한다.
- (3) TK6 세포주 시험의 경우 일반적으로 음성 및 양성 대조군을 포함한 모든 배양물에 대해 초기 및 후기 출현 돌연변이체 모두를 계수한다. 시험이 제대로 수행되었음을 입증하기 위해서는 음성 및 양성 대조군의 콜로니 특성 분석이 필요하다.

III. 시험 결과 및 보고

1. 시험의 성립조건

1.1 공통사항

시험물질에 대한 결과를 판정하기 전에 시험과정이 다음의 기준을 충족하는지 검토하여야 한다.

- (1) 음성일 경우 S9 mix를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 시험을 모두 실시하였는지의 여부
- (2) 적절한 세포 수를 사용하였는 지와 시험물질의 농도 선정이 적절한지의 여부
- (3) 최고 농도의 선정기준이 적절하였는지의 여부

1.2 음성 및 양성 대조군에 대한 기준

- (1) L5178Y 세포주의 경우 돌연변이 빈도(MF, mutant frequency), 클로닝 효율(CE, cloning efficiency), 세포 성장(suspension growth) 등에 대한 아래의 기준을 만족하여야 한다.

지표	한천배지 법	마이크로웰 법
돌연변이 빈도	$35 \times 10^{-6} \sim 140 \times 10^{-6}$	$50 \times 10^{-6} \sim 170 \times 10^{-6}$
클로닝 효율	65 % ~ 120 %	65 % ~ 120 %
세포 성장	8 배 ~ 32 배 (3 시간 ~ 4 시간 노출) 32 배 ~ 180 배 (24 시간 노출)	8 배 ~ 32 배 (3 시간 ~ 4 시간 노출) 32 배 ~ 180 배 (24 시간 노출)

- (2) L5178Y 세포주의 경우, 양성 대조군이 다음 두 가지 기준 중 적어도 하나를 충족하는지 확인하여야 한다.

- a. 양성 대조군에서는 돌연변이체가 절대적으로 증가되었는지 확인되어야 하며 자발적 돌연변이체를 제하고 양성대조물질에 의해 직접 유도된 절대적 돌연변이체(IMF, induced mutant frequency) 값은 10^6 개 세포 당 300 개(300×10^{-6}) 이상이어야 한다. IMF의 최소 40 % 이상이 작은 콜로니(small colony)의 돌연변이체 계수에 반영되어야 한다.
 - b. 양성 대조군에서는 음성 대조군(용매 또는 미처리 대조군)에서 나타나는 돌연변이체 수(150×10^{-6}) 이상의 돌연변이체를 유도하여야 한다.
- (3) TK6의 경우, 동시 음성 대조군의 결과가 기존의 실험실 음성 대조군 결과와 비교해 적절한 것으로 간주될 경우 그 시험은 시험의 성립조건을 만족시킨다고 할 수 있다. 또한 동시 양성 대조군의 결과도 기존의 실험실 양성 대조군의 결과와 비교해 적절한 것으로 간주되어야 하며, 동시 음성 대조군 결과에 비해 돌연변이체가 유의적으로 증가하여야 한다.
- (4) 두 시험 모두에서, 양성 대조군 배양에서 관찰된 세포독성의 상한치는 실험군 배양에서의 값과 같아야 한다. 즉, RTG 또는 RS가 10 % 이상이어야 한다.

2. 평가와 결과의 해석

2.1 L5178Y 세포주

- (1) 음성 대조군에 대한 여러 실험실의 실험 결과를 근거로 음성 대조군에서의 돌연변이체 발현에 대한 계수(GEF, global evaluation factor)가 작성되면 이를 근거로 음성 및 양성에 대한 판정이 가능하다. 한천에서 배양하는 경우 GEF는 90×10^{-6} 이고, 마이크로 웰에서 배양하는 경우 GEF는 126×10^{-6} 이다.
- (2) 시험의 성립조건을 충족하고, 시험물질에 의해 유도된 돌연변이체의 증가 값이 GEF를 초과하면서, 농도-반응 상관관계가 나타날 경우 해당 시험물질은 명확한 ‘양성’이다.
- (3) 시험의 성립 조건을 충족하고, 시험물질에 의한 결과 값이 농도-반응 상관관계가 나타나지 않거나 돌연변이체가 증가하더라도 GEF를 초과하지 않을 경우 해당 시험물질은 명확한 ‘음성’이다.

2.2 TK6 세포주

- (1) 시험의 성립조건을 충족하고, 아래와 같은 경우에 해당하면 해당 시험물질은 명확한 ‘양성’이다.

- a. 시험농도 중 적어도 하나가 동시 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타낸 경우
- b. 증가 추세의 농도-반응 상관성이 나타난 경우
- c. 결과 중 하나라도 실험실에서 수행한 기존의 음성 대조군 자료의 분포 밖에 존재하는 경우

(2) 시험의 성립조건을 충족하고, 아래와 같은 경우에 해당하면 해당 시험물질은 명확한 ‘음성’ 이다.

- a. 시험 농도 중 어느 하나도 동시 음성 대조군에 비해 통계적으로 유의한 증가를 나타내지 않은 경우
- b. 증가 추세의 농도-반응 상관성이 나타나지 않은 경우
- c. 모든 결과가 실험실에서 수행한 기존의 음성 대조군 자료의 분포 내에 존재하는 경우

2.3 L5178Y 세포주 및 TK6 세포주 공통

- (1) 최고농도를 세포독성에 근거하여 설정한 경우, RTG 또는 RS가 10 % ~ 20 % 범위에 존재하도록 한다.
- (2) 양성 판정은 (1)의 기준을 만족할 경우에만 가능하며 10 % 미만에 존재하는 경우의 조건에서는 시험물질에 대해 양성판정을 내릴 수 없다.
- (3) 10 % ~ 20 % 범위에 존재하는 RTG 또는 RS 값이 없을 경우라도, 다음의 기준에 해당하면 음성판정을 내릴 수 있다.
 - a. RTG 또는 RS 값이 20 % ~ 100 %인 범위에서 돌연변이의 증거가 없어야 한다. 단, 이 때 RTG 또는 RS 값 20 % ~ 25% 범위에서의 농도 값이 1 개 이상 포함되어야 한다.
 - b. RTG 또는 RS 값이 25 % ~ 100 %인 범위에서 돌연변이의 증거가 없어야 한다. 단, 이 때 RTG 또는 RS 값 10 % 미만 범위에서의 농도 값이 1 개 이상 포함되어야 한다.
- (4) 시험결과를 반드시 양성 또는 음성으로 표기해야만 하는 것은 아니다. 결과 값이 판정을 내리기 어려운 경우 전문가의 자문을 받거나 추가 실험을 수행하여 결론을 도출할 수도 있다.

3. 시험결과와 보고

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

- (1) 공급처, 로트 번호, 유효기간(알 수 있는 경우)
- (2) 시험물질 자체의 안정성(알 수 있는 경우)
- (3) 용매 중의 시험물질 용해도 및 안정성(알 수 있는 경우)
- (4) 시험물질이 첨가된 배지에서의 pH, 삼투압, 침전물(적절히 측정)
- (5) 단일조성물질의 경우; 물리적인 외관, 수용성 및 추가적인 물리화학적 성질, IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식, 순도, 불순물의 화학적 동일성 등에 대한 적절하고 실질적으로 실현 가능한 화학적 식별
- (6) 다조성물질, UVBC 및 혼합물질의 경우; 각 구성성분들에 대한 화학적 동일성 (위 참조), 성분의 정량적 발생 및 관련 물리화학적 성질에 의한 특징들

3.4 용매

- (1) 용매 선택에 대한 타당성
- (2) 최종 배지에서 용매의 비율

3.5 세포

- (1) 세포의 유형과 공급처 및 실험실에서의 배양 이력
- (2) 염색체 핵형의 특징 및/또는 염색체 수
- (3) 세포 배양의 유지를 위한 방법
- (4) 마이코플라스마의 존재 여부
- (5) 세포 배가시간(doubling time)

3.6 시험 조건

- (1) 시험 농도 및 계대배양 수, 농도군당 배양물 수의 선택에 대한 이론적 근거; 예를 들어 세포독성 자료 및 용해도 한계
- (2) 배지 조성, CO₂ 농도, 습도 수준

- (3) 배양 배지의 최종 농도(예: 배양 배지의 μg 또는 mg/mL 또는 mM)로 표시된 시험물질의 농도
- (4) 배양기에 첨가된 용매 및 시험물질의 농도(및/또는 부피)
- (5) 배양 온도
- (6) 배양 기간
- (7) 처리 기간
- (8) 처리 중 세포 밀도
- (9) 대사활성계의 유형과 조성(S9의 기원, S9 mix의 제조 방법, 최종 배양 배지에서 S9의 농도 또는 부피, S9의 품질 관리)
- (10) 양성 및 음성 대조물질, 각 처리 조건에 대한 최종 농도
- (11) 발현 기간(접종한 세포의 수 및 필요에 따라서는 계대 배양과 배지교환 일정을 포함)
- (12) TFT 정보 및 농도
- (13) L5178Y의 경우, 사용된 배양시스템(한천 또는 마이크로 웰)
- (14) 시험의 성립 조건
- (15) 생존한 세포와 돌연변이 된 세포를 계수하는 데 사용된 방법
- (16) 세포독성 측정 방법
- (17) 세포독성 및 사용된 시험 방법과 관련된 정보
- (18) 세포 평판배양 후 항온 배양 기간
- (19) 크기와 유형이 고려되는 경우(적절하다면, 'small, 작은', 'large, 큰' 콜로니에 대한 기준 포함), 콜로니의 정의
- (20) 시험결과의 판정에서 '양성', '음성' 및 '보류'에 대한 기준
- (21) pH, 삼투압의 측정 방법, 침전 측정에 사용된 방법(실시한 경우)

3.7 결과

- (1) 처리된 세포의 수와 각 배양 단계에 대해 계대 배양된 세포의 수
- (2) 독성지표(L5178Y의 경우 RTG, TK6의 경우 RS)
- (3) 침전의 징후 및 침전을 판단한 시간
- (4) TFT 넣은 경우와 넣지 않은 경우의 배양된 세포 수
- (5) TFT 넣지 않은 경우에서의 콜로니 수와 넣은 배지에서의 콜로니 수 및 관련 돌연변이 빈도

- (6) 음성 대조군 및 양성 대조군에 대한 콜로니 크기, 시험물질이 양성일 경우, 적어도 하나의 농도에 대한 콜로니 크기 측정 및 관련 돌연변이 빈도
- (7) 농도-반응 상관성(가능한 경우)
- (8) 동시 음성 대조군(용매 대조군) 및 양성 대조군의 정보(농도 및 용매)
- (9) 범위, 평균 및 표준 편차가 제시되어 있는 과거의 음성 대조군 및 양성 대조군 자료(농도 및 용매); 과거 대조군에 기반한 시험의 횟수
- (10) 통계 분석

3.8 결과에 대한 토론

3.9 결론

표 1. 실험실 숙련도 시험을 위한 시험물질 목록 및 양성 대조물질

분류	물질명	CAS 번호
1 차 돌연변이원 (대사활성 불필요 돌연변이원)	Methyl methanesulphonate	66-27-3
	Mitomycin C	50-07-7
	4-Nitroquinoline-N-oxide	56-57-5
2 차 돌연변이원 (대사활성 필요 돌연변이원)	Benzo(a)pyrene	50-32-8
	Cyclophosphamide	50-18-0
	Cyclophosphamide monohydrate	6055-19-2
	7,12-Dimethylbenzanthracene	57-97-6
	3-Methylcholanthrene	56-49-5

제63항 생체 외 눈 자극 및 손상시험(토끼각막세포주시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 토끼각막세포주(SIRC, statens seruminstitut rabbit cornea)를 이용하여 MTT 방법으로 시험물질에 의한 세포독성을 측정하고, 그 결과로부터 '눈 손상물질(카테고리 1 화학물질)'과 '눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질(카테고리 없음 화학물질)'을 평가하는데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 눈 자극(eye irritation)

눈의 전방 표면에 시험물질을 도포한 후 일어나는 눈의 변화로서 적용 후 21 일 이내에 완전히 회복 가능한 정도. '가역적 눈 영향' 및 'UN GHS 카테고리 2'와 동일한 개념으로 상호 혼용 가능

2.2 눈 손상(serious eye damage)

눈의 전방 표면에 시험물질을 적용한 후 21 일 이내에 완전히 회복할 수 없는 눈 조직의 손상 또는 시력의 심각한 물리적 감퇴. '비가역적 눈 영향' 및 'UN GHS 카테고리 1'과 동일한 개념으로 상호 혼용 가능

II. 시험

1. 고려사항

(1) 검증결과에 근거하여 볼 때 이 시험법은 '눈 손상을 일으키는 물질, UN GHS 카테고리 1' 또는 '분류가 필요하지 않은 물질, UN GHS 카테고리 없음'에 대해서는 적용이 가능하나, 이 시험법으로 얻는 결과를 바탕으로 시험물질을 UN GHS 카테고리 2, 2A, 2B 등으로 분류하는 것은 적절하지 않다. 이를 위해서는 다른 적절한 시험방법을 사용한 추가시험이 필요하다.

(2) 가수분해에 민감한 시험물질은 가수분해를 촉진하지 않는 조건으로 시험하며, 미네랄 오일에 용해되지 않거나 최소 5분 동안 안정된 현탁액을 형성하지 않는 휘발성물질은 이 시험법에 적절하지 않다.

2. 원리

이 시험은 토끼각막세포주를 96 웰 플레이트에 배양하고 시험물질을 0.05 % 및 5 % 농도로 각각 5 분간 노출시킨 후, MTT 방법으로 세포 생존율을 측정함으로써 눈의 자극 및 손상을 평가하는 생체 외 시험법이다. 세포 생존율이 두 농도에서 모두 70 % 이하인 경우에는 '카테고리 I' 물질로 분류하며 70 %를 초과하는 경우에는 '카테고리 없음' 물질로 분류한다.

3. 시험의 준비

3.1 세포배양

(1) SIRC 세포는 10 % 혈청이 함유된 eagle' s minimum essential medium (MEM) 배지로 37 °C 및 5 % CO₂ 조건에서 계대 배양한다. 시험에 사용되는 동결세포는 해동 후 25 계대수를 넘기지 않아야 한다.

(2) 배양 세포를 96 웰 플레이트에 분주하며 접종 4 일 후 사용할 경우에는 6.0×10^3 세포/웰, 접종 5 일 후 사용할 경우에는 3.0×10^3 세포/웰 농도로 분주한다(200 μ L/웰 기준). 위의 농도로 플레이트에 분주된 세포는 시험물질 노출 전에 80 % 이상의 세포 밀집 상태에 도달한다.

3.2 시험물질의 조제

(1) 시험물질의 용매로는 생리식염수를 우선 선택한다. 생리식염수에 대한 용해도가 낮거나 균질한 현탁액으로 존재하지 않는 시험물질의 경우에는 5 % dimethyl sulfoxide (DMSO)를 용제로 사용한다. DMSO에서도 용해도가 낮거나 균질한 현탁액으로 존재하지 않을 경우에는 미네랄 오일을 사용한다. 휘발성이 높은 시험물질 (6 kPa 이상의 증기압)의 경우, 미네랄 오일에 용해되거나 균질한 현탁액으로 존재하는 경우에는 미네랄 오일을 용매로 사용한다.

(2) 시험물질을 5 % (w/w) 농도로 용해시키거나 또는 균질하게 현탁시킨 후 10 배 간격으로 계열 희석하여 0.05 % 농도를 조제한다. 시험물질(단일조성물질, 다조성물질 또는 혼합물질)은 순도에 관계없이 순수한 물질로 간주하여 희석 또는 현탁시킨다.

3.3 대조물질의 조제

(1) 사용한 세포배양 배지, 시험물질 조제에 사용한 용매를 대조군으로 사용한다.

대조군에 사용된 용매는 각막세포주의 생존율에 영향을 미치지 않아야 한다.

(2) 양성대조군은 0.01 %의 sodium lauryl sulfate (SLS)를 사용한다. 무처리군 (blank)은 광학 밀도에 대한 보상을 결정하는 데 필요하며 세포를 포함하지 않는 배지 또는 용매만을 첨가한다.

3.4 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 본 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 11종의 숙련도 물질에 대해 시험하고 그 결과값이 일치되는지를 확인해야 한다.

표 1. 생체 외 눈 자극성 및 손상시험에 대한 숙련도 시험의 물질 및 그 결과

물질	CAS 번호	화학적 분류	물리적 상태	생체 내 UN GHS Cat.*	STE 시험에서의 용매/용제	STE UN GHS Cat.
Benzalkonium chloride (10 %, aqueous)	8001-54-5 또는 63449-41-2	Onium compound	액체	카테고리 1	생리식염수	카테고리 1
Triton X-100 (100 %)	9002-93-1	Ether	액체	카테고리 1	생리식염수	카테고리 1
Acid Red 92	18472-87-2	Heterocyclic compound; Bromine compound; Chlorine compound	고체	카테고리 1	생리식염수	카테고리 1
Sodium hydroxide	1310-73-2	Alkali; Inorganic chemical	고체	카테고리 1	생리식염수	카테고리 1
Butyrolactone	96-48-0	Lactone; Heterocyclic compound	액체	카테고리 2A	생리식염수	보류
1-Octanol	111-87-5	Alcohol	액체	카테고리 2A/B	미네랄 오일	보류
Cyclopentanol	96-41-3	Alcohol; Hydrocarbon, cyclic	액체	카테고리 2A/B	생리식염수	보류
2-Ethoxyethyl acetate	111-15-9	Alcohol; Ether	액체	카테고리 없음	생리식염수	카테고리 없음
Dodecane	112-40-3	Hydrocarbon; acyclic	액체	카테고리 없음	미네랄 오일	카테고리 없음
Methyl isobutyl ketone	108-10-1	Ketone	액체	카테고리 없음	미네랄 오일	카테고리 없음
Glycerol	56-81-5	Alcohol	액체	카테고리 없음	생리식염수	카테고리 없음

*; 생체 내 토끼 눈 시험(OECD TG405) 결과와 UN GHS 사용 결과를 바탕으로 함.

4. 시험 방법

4.1 시험물질 및 대조물질의 노출

(1) 각 시험물질(0.05 % 및 5 %) 처리군, 배지대조군, 용매대조군, 양성대조군 (0.01 % SLS)은 매 시험마다 3 개 웰로 구성하며 웰 당 부피는 200 μ L를 기준으로 한다. 시험물질 노출은 실온에서 5 분간 실시하며 대조군도 동일하다.

(2) 시험물질을 평가할 때 눈 자극 및 손상에 대한 기존의 정보가 알려져 있는 기준물질을 같이 사용하면 좋다.

4.2 세포 생존율 측정

(1) 시험물질 노출 후, 세포를 200 μ L의 인산완충용액으로 2 회 세척하고 200 μ L의 MTT 용액(0.5 mg/mL 배지)을 첨가한다. 5 % CO₂ 배양기에서 37 °C로 2 시간 동안 반응시킨다.

(2) 이후 배지를 제거하고, 생성된 MTT 포르마잔을 0.04 N hydrochloric acid-isopropanol 200 μ L를 첨가하여 60 분간 추출한 후 그 용액의 흡광도를 570 nm에서 플레이트 판독기로 측정한다.

(3) 시험물질의 착색이 MTT법의 측정분석을 간섭하는지 판단해야 하며, 세포가 함유되지 않고 시험물질만 처리한 웰에서의 측정값 등 간섭 여부를 확인할 수 있는 자료를 제시해야 한다.

(4) 시험물질이 MTT법의 측정분석에 간섭 영향을 미칠 경우에는, MTT법 이외의 세포 생존율 측정에 관한 다른 방법을 사용할 수 있다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험의 성립조건

시험 결과는 다음 기준을 모두 만족해야 하며 하나라도 충족되지 않은 경우에는 추가적으로 반복시험을 실시한다.

(1) 무처리 대조군(blank)의 흡광도를 뺀 대조군의 흡광도 값은 0.3 이상이다.

(2) 용매대조군의 세포 생존율은 배지대조군의 세포 생존율 대비 80 % 이상이다.

(3) 양성대조군의 세포 생존율은 기존 평균값의 2 배 표준편차 이내이다.

(4) 3 회의 반복시험에 의한 시험물질 결과값의 편차는 15 % 미만이다. 이때 15 % 이상일 경우에는 해당 시험결과는 사용할 수 없으며 3 회의 반복시험을 추가로 실시해야 한다.

2. 결과 해석 및 판정

(1) 용매대조군의 세포 생존율을 100 %로 하고 각 시험물질에 대한 세포 생존율을 구한다. 각 흡광도는 무처리 대조군의 흡광도를 뺀 값으로 한다.

(2) 시험물질 처리군 및 용매대조군은 각각 3 개 웰을 사용하며 3 회의 독립적인

반복시험을 수행한다. 3 개 웰의 흡광도 산술 평균을 사용하여 상대적인 세포 생존율을 계산하며 시험물질의 최종 세포 생존율은 3 회의 독립적인 반복시험 결과에 대한 산술평균으로 나타낸다.

(3) 시험결과에 대한 판정기준은 아래 표 2와 같다.

표 2. 토끼 각막세포주에 대한 시험물질 생존율 및 UN GHS 분류 기준

세포 생존율		UN GHS 카테고리
시험물질 5 %	시험물질 0.05 %	
> 70 %	> 70 %	No category(카테고리 없음)
≤ 70 %	> 70 %	No stand-alone prediction can be made(보류)
≤ 70 %	≤ 70 %	Category I(카테고리 1)

3. 시험결과의 보고

시험보고서에 아래의 정보가 포함되어야 하며 특히, 시험자료는 전반적인 결과의 평균값과 표준편차, 카테고리 분류 및 각 웰에 대한 세포 생존율 값 등을 상세히 제시한다.

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 시험물질

(1) 단일조성물질

- 화학물질 식별(IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 등), 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류 및 가능한 범위까지의 연구 수행 관련 추가 물리화학적 성질, 순도, 불순물, 시험 전 처리(해당되는 경우, 가온, 분쇄), 저장 조건 및 안정성

(2) 다조성물질, UVCB 및 혼합물질

- 화학물질 식별(IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 등), 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류 및 가능한 범위까지의

연구 수행 관련 추가 물리화학적 성질, 순도, 불순물, 시험 전 처리(해당되는 경우, 가온, 분쇄), 저장 조건 및 안정성

(3) 양성대조군 및 용매대조군

(4) 선택한 용매에서 5분 동안의 용해도(시험물질의 안정성)

3.4 시험조건 및 방법

(1) 시험의뢰자 및 시험기관에 대한 정보

(2) 시험 방법에 대한 설명

(3) 세포주 및 구입처, 계대 배양 수 및 시험에 사용된 세포의 밀집도

(4) 사용된 시험 절차의 세부 사항

(5) 처리 물질 당 웰 수 및 반복시험의 수

(6) 시험물질 처리 농도

(7) 용매 선정의 타당성

(8) 시험물질 노출 기간

(9) 시험 절차의 변경사항(있을 경우)

(10) 판정기준

(11) 실험실에 존재하는 기존의 양성대조군의 평균 및 표준편차값(참고문헌)

(12) 숙련도 시험결과

3.5 결과

(1) 각각의 시험물질 및 대조물질의 웰 당 개별 흡광도 값, 반복시험의 흡광도에 대한 산술평균값, 매 반복시험 마다의 세포 생존율 및 산술평균값과 편차 등을 표로 작성한다.

(2) 배지 대조군, 용매 대조군 및 양성 대조군에 대한 시험결과

(3) 시험물질과 MTT와의 반응성, 시험물질의 MTT 측정 간섭 등에 대한 설명

3.6 토의

3.7 결론

제64항 생체의 눈 자극 및 손상 시험(인체각막모델시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 3 차원 구조의 인체각막모델을 이용하여 시험물질에 의한 세포독성을 MTT 또는 WST-8 및 WST-1방법으로 측정하여 눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질을 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 눈 자극(Eye irritation)

눈의 전방 표면에 시험물질을 도포한 후 일어나는 눈의 변화로서, 적용 후 21 일 이내에 완전히 회복 가능한 정도. '가역적 눈 영향' 및 'UN GHS 카테고리 2'와 동일한 개념으로 상호 혼용 가능

2.2. 눈 손상(Serious eye damage)

눈의 전방 표면에 시험물질을 적용한 후 21 일 이내에 완전히 회복할 수 없는 눈 조직의 손상 또는 시력의 심각한 물리적 감퇴. '비가역적 눈 영향' 및 'UN GHS 카테고리 1'과 동일한 개념으로 상호 혼용 가능

2.3. 각막(Cornea)

홍채와 눈동자를 감싸고 안쪽으로 빛을 받아들이는 안구의 투명한 부분

2.4. 인체각막모델(RhCE, Reconstructed Human Cornea-like Epithelium)

조직학적, 형태학적, 생화학적 및 생리학적 특성이 인체의 각막상피구조의 특성과 동일하게 구성된 3 차원 형태의 세포구조물. 다양한 모델이 상업적으로 시판 중

II. 시험

1. 원리

본 시험은 3 차 구조로 제작된 인체각막모델에 시험물질을 도포하고, 일정 시간 노출시킨 후 시험물질을 세척하고 후배양 시킨 후 각막모델을 구성하는 세포의 생존율을 측정함으로써 인체각막조직의 자극 및 손상을 평가하는 생체 외 분석 방법이다.

2. 고려사항

이 시험은 단일물질, 혼합물, 고체, 액체, 반고체 및 왁스에 적용할 수 있으나 가스 및 에어로졸에는 적용하지 않는다. 또한, UN GHS 카테고리 2(눈 자극/가역적 눈 영향) 및 카테고리 1(눈 손상/비가역적 눈 영향)과 선택적 카테고리 2A(눈 자극) 및 선택적 카테고리 2B(약한 눈 자극) 사이의 차이를 구별할 수 없으므로, 이러한 경우 다른 생체 외(*in vitro*) 시험법을 사용한 추가 시험이 필요하다.

3. 시험의 준비

3.1. 인체각막모델

3.1.1. 종류

생체 외 눈 자극 및 손상 시험을 수행을 위해 인체각막모델을 사용한다. OECD 에서 그 적정성이 인정된 모델로서 상업적으로 구입이 가능한 EpiOcular™ OCL-200, SkinEthic™ HCE/S, 또는 LabCyte CORNEA-MODEL24 및 MCTT HCE™ 등을 사용한다.

3.1.2. 일반조건

인체각막모델은 생체 내 각막 상피의 3 차원 구조와 유사하며, 공기와 직접 접촉하는 상피 표면을 가져야만 생체 내에서 노출되는 것과 유사한 방식으로 노출 된다. 아울러 세포독성의 기준물질인 Triton X-100 또는 Sodium Dodecyl Sulfate(SDS)의 침투에 견딜 수 있는 충분한 견고성을 갖춘 기능성 장벽을 형성 해야 한다. 인체각막모델 제작에 사용된 인간 유래 세포는 박테리아, 바이러스, 마이코플라스마 및 곰팡이에 의한 오염이 없어야한다.

3.1.3. 기능조건

(1) 생존율

인체각막모델의 생존율은 MTT법 또는 WST-8 및 WST-1방법으로 측정하며 이때 시험물질을 처리하지 않은 음성 대조군에 대한 흡광도 최고치와 최저치의 기준은 아래 표 1을 만족하여야 한다. 세포 생존율 측정법에 사용되는 용매는 세포 생존율의 측정을 방해하지 않아야 하며 용매만의 흡광도는 0.1 이하로 충분히 낮아야 한다.

표 1. 음성 대조군에 대한 MTT법 또는 WST-8 및 WST-1방법에서의 흡광도 범위

인체각막모델	세포 생존율 시험	최저값 기준	최고값 기준
EpiOcular™ EIT(OCL-200)	MTT법	> 0.8	< 2.5
SkinEthic™ HCE EIT(HCE/S)	MTT법	> 1.0	≤ 2.5
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	WST-8법	≥ 0.5	≤ 1.6
MCTT HCE™ EIT	WST-1법	≥ 1.6	≤ 3.0

(2) 방어벽 기능

인체각막모델은 세포독성 기준물질(Triton X-100, SDS)이 빠르게 투과하지 않을 정도의 충분히 견고한 방어벽 기능을 가지고 있어야 한다. 이때 방어벽 기능의 정도는 IC₅₀이나 ET₅₀으로 나타낼 수 있는데 그 기준은 표 2와 같다.

표 2. 인체각막모델의 적정성 판단기준

인체각막모델	최저값 기준	최고값 기준
EpiOcular™ EIT(OCL-200) (0.3 % triton X-100의 100 μL)	ET ₅₀ = 12.2 분	ET ₅₀ = 37.5 분
SkinEthic™ HCE EIT(HCE/S) (50 μL SDS 30 분 처리)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 3.2 mg/mL
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (25 μL SDS 60 분 처리)	IC ₅₀ = 1.0 mg/mL	IC ₅₀ = 4.0 mg/mL
MCTT HCE™ EIT (0.3 % triton X-100의 50 μL)	ET ₅₀ = 17.6 분	ET ₅₀ = 41.0 분

3.2. 숙련도 시험

이 시험법에 따라 시험을 수행하는 실험실은 사전에 이미 충분한 숙련도가 있음을 입증하여야 한다. 이를 위해서는 표 3에 열거된 15 종의 숙련도 시험대상 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표에 제시된 바와 일치하는 지를 확인하여야 한다.

4. 시험 방법

4.1. 시험물질 및 대조물질의 노출

인체각막모델의 종류에 따라 세부적인 시험절차는 조금씩 다르므로 실험자는 사용하는 인체각막모델에 맞는 절차에 따라 진행하도록 한다. 세부적인 절차는 표 4에 제시되어 있다.

4.1.1. 인체각막모델

- (1) 각 시험마다 각각의 시험물질과 대조물질에 대해 최소 2 개 웰의 인체각막모델을 사용한다.
- (2) 인체각막모델의 표면은 시험물질 처리 전에 칼슘 및 마그네슘이 없는 ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(DPBS)를 사용하여 사전에 축축한 상태로 유지되어야 한다. 각막모델의 표면을 균일하게 덮기에 충분한 양을 노출시키되 과량의 물질이 노출되지 않도록 한다.

표 3. 각각의 인체각막모델에 대한 숙련도 시험물질 및 그 결과

화학물질 명	CAS 번호	유기작용기	물리적 상태	VRM 1 생존율(%)	VRM 2 생존율(%)	Labcyte 생존율(%)	MCTT HCE 생존율(%)	VRM 예측	색 간섭
생체 내 카테고리 1									
Methylthioglycolate	2365-48-2	Carboxylic acid ester; Thioalcohol	액체	10.9±6.4	5.5±7.4	1.7±1.2	25.3±6.0	관정 보류	아니오
Hydroxyethyl acrylate	818-61-1	Acrylate; Alcohol	액체	7.5±4.75	1.6±1.0	7.5±4.75	9.8±7.7	관정 보류	아니오
2,5-Dimethyl-2,5-hexanediol	110-03-2	Alcohol	고체	2.3±0.2	0.2±0.1	2.8±2.6	0.5±0.1	관정 보류	아니오
Sodium oxalate	62-76-0	Oxocarboxylic acid	고체	29.0±1.2	5.3±4.1	3.7±1.5	30.6±6.3	관정 보류	아니오
생체 내 카테고리 2A									
2,4,11,13-Tetraazatetradecane-diimidamide, N,N''-bis(4-chlorophenyl)-3,12-diimino-, di-D-gluconate (20 %, aqueous)	18472-51-0	Aromatic heterocyclic halide; Aryl halide; Dihydroxyl group; Guanidine	액체	4.0±1.1	1.3±0.6	0.4±0.4	1.8±0.1	관정 보류	예 (약함)
Sodium benzoate	532-32-1	Aryl; Carboxylic acid	고체	3.5±2.6	0.6±0.1	2.9±2.6	1.1±0.5	관정 보류	아니오
생체 내 카테고리 2B									
Diethyl toluamide	134-62-3	Benzamide	액체	15.6±6.3	2.8±0.9	32.4±9.3	2.3±2.2	관정 보류	아니오
2,2-Dimethyl-3-methylenebicyclo [2.2.1] heptane	79-92-5	Alkane, branched with tertiary carbon; Alkene; Bicycloheptane; Bridged-ring carbocycles; Cycloalkane	고체	4.7±1.5	15.8±1.1	2.2±2.6	22.9±11.5	관정 보류	아니오
생체 내 카테고리 없음									
1-Ethyl-3-methylimidazoliumethylsulphate	342573-75-5	Alkoxy; Ammonium salt; Aryl; Imidazole; Sulphate	액체	79.9±6.4	79.4±6.2	48.0±8.9	56.8±3.4	카테고리 없음	아니오
Dicaprylyl ether	629-82-3	Alkoxy; Ether	액체	97.8±4.3	95.2±3.0	92.7±5.0	89.9±8.9	카테고리 없음	아니오
Piperonyl butoxide	51-03-6	Alkoxy; Benzodioxole; Benzyl; Ether	액체	104.2±4.2	96.5±3.5	95.6±14.0	82.4±14.5	카테고리 없음	아니오
Polyethylene glycol (PEG-40) hydrogenated castor oil	61788-85-0	Acylal; Alcohol; Allyl; Ether	점성	77.6±5.4	89.1±2.9	62.6±11.5	72.1±14.8	카테고리 없음	아니오
1-(4-Chlorophenyl)-3-(3,4-dichlorophenyl) urea	101-20-2	Aromatic heterocyclic halide; Aryl halide; Urea derivatives	고체	106.7±5.3	101.9±6.6	77.8±9.0	94.5±5.9	카테고리 없음	아니오
2,2'-Methylene-bis-(6-(2H-benzotriazol-2-yl)-4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol)	103597-45-1	Alkane branched with quaternary carbon; Fused carbocyclic aromatic; Fused saturated heterocycles; Precursors quinoid compounds; tert-Butyl	고체	102.7±13.4	97.7±5.6	90.2±5.8	98.8±10.1	카테고리 없음	아니오
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	Inorganic Salt	고체	88.6±3.3	92.9±5.1	66.6±0.2	90.5±6.3	카테고리 없음	아니오

VRM 1: 검증된 기준 방법, EpiOcular™ EIT

VRM 2: 검증된 기준 방법, SkinEthic™ HCE EIT

4.1.2. 액체 시험물질

- (1) 액체 시험물질은 각막모델의 표면에 골고루 퍼지도록 노출시킨다. 인체각막모델의 종류에 따라 도포시키는 시험물질의 양은 서로 다르며, 시험물질 노출 시간도 1 분, 10 분 또는 30 분 등으로 다르다.
- (2) 노출 기간이 끝나면 상온에서 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ free-DPBS로 시험물질을 세척하고 조직에 흡수된 모든 시험물질과 대조물질을 제거하기 위해 일정시간 실온의 새 배지에 담가둔 후 배지를 교체하고 새 배지로 후배양(Post-incubation)을 실시한다.

4.1.3. 고체 시험물질

- (1) 고체 시험물질은 가능한 미세분말 형태로 노출시키며 도포된 시험물질의 양은 조직의 전체 표면을 덮기에 충분하여야 한다. 각막모델에 따라 cm^2 면적 당 도포하는 물질의 양은 서로 다르다.
- (2) 각막모델에 따라 일정시간 동안 시험물질을 노출시킨 후 노출 기간이 끝나면 상온에서 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free DPBS로 시험물질을 세척하고 조직에 흡수된 모든 시험물질과 대조물질을 제거하기 위해 일정시간 실온의 새 배지에 담가둔 후 배지를 교체하고 새 배지로 후배양을 실시한다.

4.1.4. 양성 대조물질 및 음성 대조물질

음성 대조물질은 증류수 또는 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free DPBS를 주로 사용하며, 양성 대조물질은 Methyl acetate, Ethanol 또는 Lauric acid를 사용한다. 인체각막모델에 따라 사용하는 물질이 다를 수 있으므로 주의한다.

표 4. 인체각막모델에 대한 시험물질 및 대조물질의 노출방법

	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	MCTT HCE™ EIT
표면적	0.6 cm ²	0.5 cm ²	0.3 cm ²	0.6 cm ²
조직 반복 수	최소 2 개 이상	최소 2 개 이상	3 개	최소 2 개 이상
A) 전 배양	20 µL DPBS 37 °C(± 2 °C), 30 분(± 2 분)	-	-	-
B) 화학물질 처리				
B-1) 처리 용량				
액체	50 µL (83.3 µL/cm ²)	10 µL DPBS + 30 µL ± 2 µL (60 µL/cm ²) (필요 시 나일론 망 사용)	50 µL (167 µL/cm ²)	40 µL (67 µL/cm ²)
고체	50 mg (83.3 mg/cm ²)	30 µL DPBS + 30 mg ± 2 mg (60 mg/cm ²)	10 mg (33 mg/cm ²)	40 µL DPBS + 40 mg ± 1 mg (67 µL/cm ²)
B-2) 노출 시간				
액체	30 분(± 2 분)	30 분(± 2 분)	1 분(± 5 초)	10 분(± 1 초)
고체	6 시간(± 0.25 시간)	4 시간(± 0.1 시간)	24 시간(± 1 시간)	3 시간(± 5 분)
B-3) 배양 온도				
액체	37 °C(± 2 °C)	37 °C(± 2 °C)	실온	37 °C(± 2 °C)
고체	37 °C(± 2 °C)	37 °C(± 2 °C)	37 °C(± 2 °C)	37 °C(± 2 °C)
B-4) 세척 (실온에서 수행)				
액체	100 mL DPBS, 3 회	20 mL DPBS	흐르는 DPBS, 10 회 이상	PBS, 4 회
고체	100 mL DPBS, 3 회	25 mL DPBS	흐르는 DPBS, 10 회 이상	10 mL PBS, 4 회 및 비커에서 30 mL PBS로 진탕

	EpiOcular™ EIT (VRM 1)	SkinEthic™ HCE EIT (VRM 2)	LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT	MCTT HCE™ EIT
B-5) 후 침적				
액체	12 분(± 2 분), 실온, 배지	30 분(± 2 분), 37 °C, 배지	-	-
고체	25 분(± 2 분), 실온, 배지	30 분(± 2 분), 실온, 배지	-	-
C) 후배양				
액체	120 분(± 15 분), 37 °C, 배지	-	24 시간(± 1 시간), 37 °C, 배지	16 시간(± 1 시간), 37 °C, 배지
고체	18 시간(± 0.25 시간), 37 °C, 배지	18 시간(± 0.5 시간), 37 °C, 배지	-	16 시간(± 1 시간), 37 °C, 배지
D) 음성 대조군				
액체	H ₂ O 50 µL(동시 처리)	DPBS 30 µL(± 2 µL) (동시 처리)	DPBS 50 µL(동시 처리)	DPBS 40 µL(동시 처리)
고체	H ₂ O 50 µL(동시 처리)	DPBS 30 µL(± 2 µL) (동시 처리)	-	DPBS 40 µL(동시 처리)
E) 양성 대조군				
액체	Methyl acetate 50 µL (동시 처리)	Methyl acetate 30 µL (±2 µL)(동시 처리)	Ethanol 50 µL (동시 처리)	40 µL Methyl acetate 또는 2 % SDS (동시 처리)
고체	Methyl acetate 50 µL (동시 처리)	Methyl acetate 30 µL (±2 µL)(동시 처리)	Lauric acid 10 mg (동시 처리)	40 µL Methyl acetate 또는 2 % SDS (동시 처리)

DPBS : Ca²⁺/Mg²⁺-free Dulbecco's PBS

4.2. 생존율 측정

- (1) EpiOcular™ OCL-200과 SkinEthic™ HCE/S 모델에 대해서는 MTT법을, LabCyte CORNEA-MODEL24 모델에 대해서는 WST-8법을 사용하며 MCTT HCE™ EIT 모델에 대해서는 WST-1법을 사용하여 각막모델의 세포 생존율을 구한다.
- (2) 시험물질이 착색되어 있거나 반응 후 착색되어 MTT법, 또는 WST-8법 또는 WST-1법의 측정흡광도를 간섭할 수 있는 경우에는 착색 대조군 등을 추가로 사용하여 간섭영향을 배제하여야 한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 시험의 성립조건

- (1) 인체각막모델은 표 1 음성 대조물질에 대한 기준과 표 2에 제시된 방어벽 기능에 대한 기준을 만족하여야 한다.
- (2) 동일 물질, 동일 농도에 대해 보통 2 개 웰 또는 3 개 웰을 사용하며 이 때 웰 간의 결과 값 차이는 크지 않아야 한다. 2 개 웰의 생존율 결과 값의 차이는 20 % 미만, 3 개 웰 간의 표준 편차는 18 %를 초과하지 않아야 한다.
- (3) 양성 대조군의 생존율은 음성 대조군의 생존율과 비교하여 적정 범위 내에 있어야 하며 EpiOcular™ OCL-200 모델을 사용하는 경우에는 50 % 미만, SkinEthic™ HCE/S 경우 액체 시험물질은 30 % 이하이어야 하고 고체 시험물질인 경우에는 20 % 이하이어야 한다. LabCyte CORNEA-MODEL24 모델을 사용하는 경우에는 양성 대조군의 생존율은 음성 대조군에 비해 40 % 이하로 나타나야 한다. MCTT HCE™ EIT 모델을 사용하는 경우에는 양성 대조군의 생존율은 음성 대조군에 비해 35 % 이하로 나타나야 한다.

2. 결과 해석 및 판정

- (1) 음성(용매) 대조군의 생존율을 100 %로 하고 각 시험물질의 각막모델 2 개 웰에 대한 평균 생존율을 구한다. 표 5는 시험에 사용된 인체각막모델에 따라 시험물질의 생존율을 바탕으로 한 UN GHS 분류 기준 값을 제시한 것이다.

표 5. 인체각막모델에 대한 시험물질 생존율 및 UN GHS 분류 기준

인체각막모델	No Category (카테고리 없음)	No prediction can be made (판정 보류)
EpiOcular™ EIT(OCL-200) (고체 및 액체 시험물질)	평균 생존율 > 60 %	평균 생존율 ≤ 60 %
SkinEthic™ HCE EIT(HCE/S) (액체 시험물질)	평균 생존율 > 60 %	평균 생존율 ≤ 60 %
SkinEthic™ HCE EIT(HCE/S) (고체 시험물질)	평균 생존율 > 50 %	평균 생존율 ≤ 50 %
LabCyte CORNEA-MODEL24 EIT (고체 및 액체 시험물질)	평균 생존율 > 40 %	평균 생존율 ≤ 40 %
MCTT HCE™ EIT (액체 시험물질)	평균 생존율 > 35 %	평균 생존율 ≤ 35 %
MCTT HCE™ EIT (고체 시험물질)	평균 생존율 > 60 %	평균 생존율 ≤ 60 %

(2) 각막모델 2 개 웰을 사용하여 시험한 결과 값이 명확하면 그것으로 충분하다. 그러나 결과 값이 기준치에 근접한 경계치로 나올 경우 재시험을 실시한다. 첫 번째 시험결과와 재시험의 결과가 일치하지 않을 경우 세 번째 시험을 실시하여야 한다.

3. 시험결과의 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야 한다.

3.1. 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2. 시험책임자 및 담당자 성명

3.3. 시험물질

3.3.1. 단일조성물질

- (1) 화학물질 식별(IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 등)
- (2) 물리적 상태, 휘발성, pH, LogP, 분자량, 화학적 분류 및 가능한 범위까지의 연구 수행 관련 추가 물리화학적 성질

- (3) 순도, 불순물 확인 등
- (4) 시험 전 처리(해당되는 경우, 가온, 분쇄)
- (5) 저장 조건 및 안정성

3.3.2. 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable Composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질

- (1) 성분의 화학적 동일성, 함량 및 관련있는 물리·화학적 성질
- (2) 물리적 상태 및 가능한 범위까지의 연구 수행 관련 추가 물리화학적 성질
- (3) 순도, 불순물 확인 등
- (4) 시험 전 처리(해당되는 경우, 가온, 분쇄)
- (5) 저장 조건 및 안정성

3.3.3. 양성 및 음성 대조물질

- (1) 화학물질 식별(IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 등)
- (2) 물리적 상태, 휘발성, 분자량, 화학적 분류 및 가능한 범위까지의 연구 수행 관련 추가 물리화학적 성질
- (3) 전처리(해당되는 경우, 가온, 분쇄)
- (4) 저장 조건 및 안정성
- (5) 표 4에 제시된 것과 다른 음성대조군을 사용한 경우 논리적 타당성
- (6) 표 4에 제시된 것과 다른 양성대조군을 사용한 경우 논리적 타당성
- (7) 기존의 양성 및 음성 대조군에 대한 시험결과(참고문헌 제시)

3.4. 시험의뢰자 및 시험기관에 대한 정보

- (1) 시험의뢰자, 시험 기관과 시험 책임자의 이름과 주소

3.5. 시험조건

- (1) 인체각막모델명(배치번호 포함)
- (2) 측정과장 및 대역(해당되는 경우) 및 흡광도 측정 장치(예 : 분광 광도계)
- (3) 측정 방법에 대한 설명

- (4) HPLC / UPLC - 분광 광도계 시스템에 대한 설명
- (5) 인체각막모델과 관련한 정보; 생존율 품질 관리(공급 업체), 시험 방법 조건 하에서의 생존율, 방어벽 기능의 품질 관리, 형태학적 정보, 재현성 및 예측능, 기타 품질관리 내용
- (6) 인체각막모델 시험에 관한 과거의 시험자료
- (7) 숙련도물질에 대한 실험 결과

3.6. 시험의 성립조건

- (1) 양성 및 음성 대조군의 평균, 허용범위
- (2) 양성 및 음성 대조군에서 인체각막조직(2 개 웰)의 허용오차범위
- (3) 시험물질 처리군에서 인체각막조직(2 개 웰)의 허용오차범위

3.7. 시험방법

- (1) 시험방법의 세부 사항
- (2) 시험물질 및 대조물질의 투여(도포)량
- (3) 노출 시간, 노출 온도, 노출 후 세정을 위한 담금 시간 및 후배양 시간
- (4) 시험방법을 수정할 경우 이에 대한 설명
- (5) 착색 및 간섭물질에 대한 사항
- (6) 시험물질, 대조물질 등에 사용된 각막모델의 수

3.8. 결과

- (1) 시험결과의 모든 자료에 대한 정리표
- (2) 착색 및 간섭물질에 대한 자료
- (3) 시험의 성립조건과 관련한 시험물질 및 대조물질의 결과
- (4) 기타 시험물질에 의한 인체각막조직의 착색 여부 등

3.9. 토의

3.10. 결론

제65항 에스트로겐 수용체 결합 측정시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 인간 재조합 에스트로겐 수용체 알파 (hrER α , human recombinant estrogen receptor alpha)에 대한 시험물질의 결합능을 분석함으로써 에스트로겐 수용체와의 친화력을 가진 화학물질을 동정하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1 [^3H]E2, [^3H]-17 β -에스트라디올

삼중 수소로 방사능 표지된 17 β -에스트라디올

2.2 hrER α (human recombinant estrogen receptor alpha)

인간 재조합 에스트로겐 수용체 α

2.3 에스트로겐 활성

에스트로겐 수용체에 결합하여 이를 활성화시키는 것으로 17 β -에스트라디올의 작용과 유사한 작용을 발현하는 화학물질의 반응

2.4 IC₅₀

[^3H]-17 β -에스트라디올의 최대 결합의 50 %를 억제하는 시험물질의 농도

2.5 기준 에스트로겐(reference estrogen)

17 β -에스트라디올(estradiol)(E2, CAS 50-28-2)

2.6 상대적 결합 친화력(RBA, relative binding affinity)

17 β -에스트라디올의 log(IC₅₀)에 대한 시험물질의 log(IC₅₀)의 백분율

II. 시험

1. 고려사항

이 시험법은 시험물질이 인간 ER α 와 결합하는 정도에 관한 평가를 수행하는 데 초점이 있으며, ER α 에 대한 작용물질 또는 길항물질을 구분하는 데 초점이 있지 않다. 또한 이 시험결과, 시험물질이 ER α 에 결합하였다고 하여 그것이 반드시 유전자 전사 또는 생리적 변화와 같은 하위 단계 반응과의 상관성을 의미하는 것은 아니다. 따라서 시험결과를 생체 내 내분비계의 복잡한 신호전달 및 조절에 직접적으로 외삽할 수는 없다.

2. 원리

- (1) 에스트로겐 수용체와 시험물질의 직접적 상호 작용을 바탕으로 인간 재조합 에스트로겐 수용체(hrER α)와의 친화력을 가진 화학물질을 검출하는 생체 외 결합 분석법이다. 이 방법을 통해 hrER α 과 결합하거나 결합하지 않는 물질에 대한 정보를 획득할 수 있으며 에스트로겐 호르몬의 반응경로에 영향을 미칠 가능성이 있는 화학물질을 확인할 수 있다.
- (2) 본 시험법은 전체 길이의 인간 에스트로겐 수용체(hrER α)를 사용하는 FW(Freyberger-Wilson) 결합 분석법을 바탕으로 작성되었다.

3. 시험의 준비

3.1 실험실 숙련도

- (1) 시험을 수행하는 실험실의 숙련도를 입증하기 위해 hrER 제제의 특이성 (specificity)과 활성(activity)을 확인하는 포화도 분석을 실시하고 아울러, hrER에 대한 기준 에스트로겐(17 β -에스트라디올)과 음성/양성 대조물질과의 경쟁적 결합 분석을 수행하여 그 결과를 본 시험법의 표 1에 나타난 결과와 일치하는지 확인하여야 한다.
- (2) 숙련도 시험은 표 1에 제시된 결합물질 10 종과 비결합물질 4 종에 대해 각각의 농도 범위 내에서 실시하며, 최소한 3 회의 독립적인 시험을 실시한다.

3.2 대조물질의 확인

시험결과에 대한 신뢰도 확인을 위해 양성 대조물질 및 음성 대조물질을 사용하며 그 내용은 아래와 같다.

- (1) 양성 대조물질 시험은 친화력의 크기에 따라 2 개 그룹으로 나눈다. 이때 강결합 양성 대조물질로는 기준 에스트로젠인 17β -에스트라디올을 사용하고, 약결합 양성 대조물질로는 norethynodrel 또는 norethindrone을 사용한다.
- (2) 음성 대조물질로는 hrER에 결합하지 않는 것으로 알려진 octyltriethoxysilane(OTES) 또는 di-n-butylphthalate(DBP)를 사용한다.
- (3) 대조물질에 대한 사용농도와 유사시험평가기준(PS, performance standard)은 표 1을 참고하며 각 물질에 대한 농도-반응 시험은 동일한 플레이트를 사용하여 같은 시험조건에서 수행한다.

3.3 시험물질, 용해도 및 농도

- (1) 시험물질 용해도의 한계치는 용매를 사용하여 먼저 결정하고, 추가로 분석조건 하에서 다시 확인한다. 시험물질의 최종 농도는 1 mM을 초과하지 않아야 한다.
- (2) 시험조건에서 수용 가능한 시험물질의 최대 농도로부터 log 스케일로 연속적으로 희석하여 8 개 농도를 정한다.

3.4 hrER α 기능의 확인

3.4.1 확인방법

시험에 사용하는 hrER α 는 그 기능이 제대로 작동하고 있는지 입증되어야 하며, 이를 위해 포화도 분석 및 경쟁적 결합 분석을 수행하기 전에 아래 2 단계 과정을 수행한다.

- (1) hrER α 특이성과 포화 상태를 입증하기 위해 [^3H]- 17β -에스트라디올에 대한 포화도 분석을 수행하고 [^3H]- 17β -에스트라디올의 hrER α 에 대한 친화력(K_d)과 수용체의 수(B_{\max})를 구한다.
- (2) 양성 대조물질(17β -에스트라디올, norethynodrel 또는 norethindrone) 및 음성 대조물질(OTES)에 대해 경쟁적 결합 분석을 실시하고 실험실에서 수행된 기준의 결과 값과 비교한다.

3.4.2 판정

hrER α 에 대한 양성 대조물질의 IC_{50} 등 관련된 결과가 표 2에 제시된 기준에 적합하여야 한다.

3.5 hrER α 농도의 결정

- (1) 활성을 유지하고 있는 수용체의 농도는 배치 및 저장 조건에 따라 변할 수 있기 때문에 시험마다 일정하게 적절한 농도를 결정하여 사용한다.
- (2) 경쟁적 결합(예, 1 nM [3 H]-17 β -에스트라디올)의 조건에서는 0.25 nM, 0.5 nM, 0.75 nM 및 1 nM 농도의 수용체에 대해, 방사능 표지 에스트라디올 농도의 1,000 배 농도인 1 μ M의 방사능 비표지 에스트라디올이 존재하지 않는 경우(총 결합 측정에 사용)와 존재하는 경우(비특이적 결합 측정에 사용)로 구분하여 배양한 후 결합도를 분석한다.
- (3) 수용체 농도에 따른 에스트라디올 특이적 결합(specific binding)을 플로팅(도식화)한다. 이때 특이적 결합은 위에서 기술한 총 결합과 비특이적 결합의 차이로 구한다.
- (4) 첨가된 [3 H]-17 β -에스트라디올 방사능의 20 %에 해당하는 특이적 결합을 보이는 수용체 농도를 포화도 분석 및 경쟁적 결합 분석시험에 사용한다. 이에 해당하는 hrER α 농도는 일반적으로 0.5 nM일 때가 많다.
- (5) 20 % 기준을 충족할 수 없는 경우란 시험 설정에 잠재적 오류가 없다면 수용체의 활성이 낮은 경우이므로 다른 배치의 수용체를 선택하여 사용할 것을 고려한다.

4. 시험방법

모든 시료가 준비된 마이크로 플레이트는 2 $^{\circ}$ C ~ 8 $^{\circ}$ C에서 16 시간 ~ 20 시간 동안 회전반 위에서 흔들어 주면서 반응시킨다. 이후 수용체에 결합된 [3 H]-17 β -에스트라디올을 결합하지 않은 [3 H]-17 β -에스트라디올과 분리하기 위해 텍스트란 코팅 활성탄(DCC, dextran coated charcoal)을 사용하며, 수용체와 결합한 분획인 상등액을 취하여 방사능을 측정함으로써 결합률을 구한다.

4.1 포화도 분석

포화도 분석은 8 개 농도의 [3 H]-17 β -에스트라디올에 대해 아래 각 조건하에서 3개 웰을 사용하여 3 회씩 실시한다. 플레이트 배치에 관한 예를 표 3-1에 제시하였으며 이를 적절히 참조한다.

- (1) [3 H]-17 β -에스트라디올과 hrER α 이 존재하는 웰에서 방사능을 측정하여 총 결합을 측정한다.

- (2) [^3H]-17 β -에스트라디올과 이 보다 1,000 배 농도의 비표지 17 β -에스트라디올이 존재하는 웰에서 hrER α 과 결합한 방사능을 측정함으로써 비특이적 결합을 측정한다. 특이적 결합은 위에서 기술한 총 결합과 비특이적 결합의 차이로 구한다.
- (3) [^3H]-17 β -에스트라디올만 있는 웰에서 측정하여 총 방사능을 확인한다.

4.2 경쟁적 결합 분석

경쟁적 결합에 대한 분석은 고정된 단일 농도의 [^3H]-17 β -에스트라디올과 여러 농도의 시험물질을 hrER α 반응시켜 얻은 결과로부터 시험물질이 수용체에 결합되는 친화력을 분석하는 것이다. 이를 위해 다음과 같이 진행한다.

4.2.1 hrER α 농도

수용체의 농도는 1 nM [^3H]-17 β -에스트라디올의 20 % \pm 5 %가 특이적으로 결합하는 농도를 사용하며 수용체 용액은 제조한 즉시 사용한다.

4.2.2 [^3H]-17 β -에스트라디올

각 웰의 [^3H]-17 β -에스트라디올의 농도는 1.0 nM로 한다.

4.2.3 대조물질

대조물질에 대한 농도 및 플레이트 배치에 관한 예를 표 3-2에 제시하였으며 이를 적절히 참조한다.

- (1) 용매 대조군, 양성 대조군 및 음성 대조군에 대한 시험을 수행하며 이때 각 대조물질의 전체 농도-반응 곡선 자료를 확보하여야 한다.
- (2) 용매 대조군은 총 결합(TB, total binding)을 측정하는 데 사용하며 용제로 사용하는 ethanol 또는 dimethyl sulfoxide (DMSO)의 농도는 최종 분석 웰에서 1.5 %이며 2 %를 초과할 수 없다.
- (3) 완충액 대조군(BC, buffer control)은 용매나 시험물질을 포함하지 않으며 완충액 대조군의 결과는 사용된 용매가 분석 시스템에 영향을 미치지 않는지 확인하는데 이용된다.
- (4) 비특이적 결합(NSB, non-specific binding)을 확인하기 위한 비표지 17 β -에스트라디올의 최고 농도는 1 μM 로 한다.

4.2.4 시험물질

시험물질의 농도 및 플레이트 배치에 관한 예를 표 3-3에 제시하였으며 이를 적절히 참조한다.

- (1) 시험물질은 용해도 범위 내에서 시험하되 시험물질의 최종 농도는 1 mM을 초과하지 않아야 한다. 용제로서 ethanol이나 DMSO를 사용할 수 있다.
- (2) 시험조건에서 수용 가능한 시험물질의 최대 농도로부터 log 스케일로 연속적으로 희석하여 8 개의 농도를 정하며 기존의 정보를 활용하여 최적의 농도 간격을 설정한다.

4.3 판정 및 분류

4.3.1 판정

매 시험마다 시험물질의 농도대비 수용체에 결합한 비율을 곡선으로 그리고 아래와 같이 판정한다. (그림 1)

- (1) 시험의 성립조건을 만족하면서 반응곡선(시험물질의 농도대비 [^3H]17 β -에스트라디올의 % 결합률)이 적절하게 작성된 경우, 반응곡선 결합률의 최저점이 50 % 미만일 때 해당 시험물질은 hrER α 의 ‘결합물질’로 간주된다.
- (2) 시험의 성립조건을 만족하면서 다음의 경우에 해당 시험물질은 hrER α 의 ‘비결합물질’로 간주된다.
 - 반응곡선이 적절하게 작성된 경우이면서 반응곡선 결합률의 최저점이 75 %를 초과할 때
 - 반응곡선이 적절하게 작성되지 않은 경우이면서 반응곡선 하단 부위의 평균 결합률이 75 %를 초과할 때
- (3) 위 조건 중 어느 것도 충족시키지 않을 경우 해당 시험물질은 ‘결정정보류’ 물질로 간주된다(예: 반응곡선의 최저점이 51 % ~ 76 % 사이).

4.3.2 분류

- (1) 평가 대상 시험물질에 대해 여러 번의 시험을 수행하고 시험의 결과 값을 표 4에 근거하여 수치화 한다.
- (2) 각 시험마다 부여된 결과 값의 평균을 구하고 평균 값의 크기에 따라 시험물질을 ‘결합물질’, ‘비결합물질’, ‘결정정보류’ 등 3 개 군으로 분류한다.

III. 시험결과 및 보고

1. 결과의 처리

1.1 포화도 분석

- (1) hrER α 에 대한 [^3H]-17 β -에스트라디올의 총 결합, 비특이적 결합, 특이적 결합을 계산한다.
- (2) [^3H]-17 β -에스트라디올 농도에 대한 hrER α 의 특이적 결합물의 곡선그래프는 hrER α 가 [^3H]-17 β -에스트라디올에 의해 포화되었음을 가리키는 정체기 (plateau) 부분이 나타나야 한다.
- (3) 수용체의 수(B_{\max}) 및 친화력(K_d)이 결정되어야 한다.

1.2 경쟁적 결합 분석

- (1) 경쟁적 결합 곡선은 시험물질의 농도(log10 단위) 마다 [^3H]-17 β -에스트라디올에 대한 특이적 결합을 도식화하여 만든다.
- (2) [^3H]-17 β -에스트라디올의 최대 결합의 50 %를 억제하는 시험물질의 농도가 IC_{50} 값이다.
- (3) 양성 대조군에 대한 $\log(IC_{50})$ 값의 추정은 4 개의 매개변수 힐 방정식에 적합한 적절한 비선형 곡선 피팅 소프트웨어를 사용하여 결정해야 한다. 상단, 하단, 기울기 및 $\log(IC_{50})$ 는 일반적으로 이 곡선을 맞추기 위해 제약을 받지 않아야 한다.
- (4) 약결합물질에 대한 상대적 결합 친화력(RBA)은 17 β -에스트라디올의 $\log(IC_{50})$ 에 대한 약결합물질의 $\log(IC_{50})$ 의 백분율로서 계산되어야 한다.
- (5) 모든 시험물질에 대한 자료는 시험자료가 적절하게 분석되고 각 경쟁적 결합 곡선이 적절하게 분류되도록 단계별 접근 방식을 사용하여 분석해야 한다.
- (6) 곡선 작업이 완료되면 곡선 적합 매개변수에 대한 기술적 검토와 각 시험 시행에 대해 생성된 경쟁적 결합 곡선에 대한 시각적 검토가 수행되어야 한다.

2. 시험의 성립조건

2.1 포화도 분석

- (1) 특이적 결합 곡선은 [^3H]-17 β -에스트라디올의 농도가 증가함에 따라 정체기에 도달함으로써 hrER α 과 [^3H]-17 β -에스트라디올의 결합이 포화상태가 되는 것을 보여주어야 한다.

- (2) 1 nM의 [^3H]-17 β -에스트라디올의 특이적 결합은 총 방사능의 평균 15 % ~ 25 %의 범위 내에 있어야 한다.
- (3) 시험 자료는 선형 스캐차트 플롯(linear Scatchard plot)을 생성해야 한다.
- (4) 비특이적 결합의 값은 일반적으로 총 결합의 35 % 미만이어야 한다.

2.2 경쟁적 결합 분석

- (1) 비표지된 17 β -에스트라디올의 농도를 증가시킴에 따라 수용체의 하나의 경쟁 결합부위로부터 [^3H]-17 β -에스트라디올이 치환되어야 한다.
- (2) 기준 에스트로겐(즉, 17 β -에스트라디올)에 대한 IC₅₀ 값은 [^3H]-17 β -에스트라디올의 몰 농도와 포화도 결합 분석으로부터 결정된 K_d 값을 더한 것과 대략 일치해야 한다.
- (3) 각 웰에 첨가된 총 방사능 농도의 평균 측정 농도가 1 nM일 때 총 특이적 결합은 20 % \pm 5 %의 허용 범위 내에서 유지되어야 한다.
- (4) 용매는 분석의 민감도 또는 재현성에 영향을 미치지 않아야 한다. 사용된 용매가 분석 시스템에 영향을 주는지를 확인하기 위해 용매 대조군의 결과를 완충액 대조군과 비교한다.
- (5) 비결합물질은 10⁻³ M(OTES) 또는 10⁻⁴ M(DBP)까지 시험했을 때, hrER α 에서 [^3H]-17 β -에스트라디올의 25 % 이상을 치환하지 않아야 한다.

3. 시험결과의 보고

3.1 시험기관의 명칭 및 소재지

3.2 시험책임자 및 담당자 성명

3.3 대조군, 기준물질, 시험물질의 정보

- (1) 공급처, 로트번호, 유효 기간
- (2) 시험물질 자체의 안정성
- (3) 용매에 대한 시험물질의 용해도와 안정성
- (4) 배지 중 pH, 삼투압과 침전물 생성
- (5) 단일조성물질의 물질 자료(CAS 명, CAS 번호) 및 물리화학적 성질
- (6) 다조성물질 및 혼합물질의 물질 자료(CAS 명, CAS 번호) 및 물리화학적 성질

3.4 용제/용매

- (1) 물질의 종류, 공급처, 로트 번호
- (2) 용제/용매 선택의 기준
- (3) 용해도와 안정성(알려진 경우)

3.5 수용체

- (1) 수용체의 공급처, 카탈로그 번호, 로트, 종류, 공급자로부터 제공된 활성 수용체 농도, 공급자로부터의 인증
- (2) 수용체의 특성 분석(포화도 결합 결과 포함): K_d , B_{max}
- (3) 수용체의 저장
- (4) 방사성 표지된 리간드의 공급처, 카탈로그 번호, 로트, 비활성(specific activity)

3.6 시험 조건

- (1) 분석 조건 하에서 용해도 한계
- (2) 완충액의 구성
- (3) 수용체의 농도
- (4) 방사성 표지된 리간드의 농도
- (5) 시험물질의 농도
- (6) 최종 분석에서의 용매 함량(%)
- (7) 배양 온도 및 시간
- (8) 결합형과 유리형의 분리 방법
 - 양성 및 음성 기준물질
 - 시험물질의 결합능에 대한 판정 기준

3.7 시험의 성립조건 확인

3.8 시험 결과

- (1) 방사능물질 자료, 결합형/유리형의 자료
- (2) 수용체의 변성 확인 점검
- (3) 최소유효농도 (LEC, lowest effective concentration)
- (4) RBA 또는 IC_{50}

(5) 농도-반응 관계

(6) 오류와 신뢰도를 측정한 통계적 분석 및 방법에 대한 설명

3.9 시험 결과에 대한 고찰

3.10 결론

표 1. 에스트로겐 수용체 결합 시험의 실험실의 숙련도 시험을 위한 물질 목록

번호	물질 명	CAS 번호	예상 반응	시험 농도 범위(M)	MeSH 화학적 분류	제품 분류
대조군(기준 에스트로겐, 약결합물질, 비결합물질)						
1	17 β -estradiol	50-28-2	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Steroid	의약품, 동물용 의약품
2	Norethynodrel (or) Norethindrone	68-23-5 (or) 68-22-4	결합	$3 \times 10^{-9} \sim 30 \times 10^{-6}$	Steroid	의약품, 동물용 의약품
3	Octyltriethoxysilane	2943-75-1	비결합	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-3}$	Silane	표면 조정제
숙련도 물질						
4	Diethylstilbestrol	56-53-1	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Hydrocarbon (cyclic), Phenol	의약품, 동물용 의약품
5	17 α -ethynylestradiol	57-63-6	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Steroid	의약품, 동물용 의약품
6	meso-Hexestrol	84-16-2	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Hydrocarbon (cyclic), Phenol	의약품, 동물용 의약품
7	Tamoxifen	10540-29-1	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Hydrocarbon (cyclic)	의약품, 동물용 의약품
8	Genistein	446-72-0	결합	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclic compound, Flavonoid,	천연물
9	Bisphenol A	80-05-7	결합	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-3}$	Phenol	화학 중간물
10	Zearalonone	17924-92-4	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-3}$	Heterocyclic compound, Lactone	천연물
11	Butyl paraben	94-26-8	결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-3}$	Carboxylic acid, Phenol	보존제
12	Atrazine	1912-24-9	비결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-6}$	Heterocyclic compound	제초제
13	Di-n-butylphthalate (DBP)	84-74-2	비결합	$1 \times 10^{-10} \sim 1 \times 10^{-4}$	Hydrocarbon (cyclic), Ester	가소제, 화학 중간물
14	Corticosterone	50-22-6	비결합	$1 \times 10^{-11} \sim 1 \times 10^{-4}$	Steroid	천연물

* 숙련도물질이 상업적으로 구매하기 어려운 경우에는 ER 결합능이 동등한 다른 화학물질로 대체가능

표 2. 양성 대조물질의 경쟁적 결합 분석 결과 및 적정 범위

물질	매개변수	평균	표준편차(n)	95 % 신뢰구간	
				하한	상한
17 β -estradiol	상단(%)	100.44	10.84(67)	97.8	103.1
	하단(%)	0.29	1.25(67)	-0.01	0.60
	Hill 기울기	-1.06	0.20(67)	-1.11	-1.02
	LogIC ₅₀ (M)	-8.92	0.18(67)	-8.97	-8.88
Norethynodrel	상단(%)	99.42	8.90(68)	97.27	101.60
	하단(%)	2.02	3.42(68)	1.19	2.84
	Hill 기울기	-1.01	0.38(68)	-1.10	-0.92
	LogIC ₅₀ (M)	-6.39	0.27(68)	-6.46	-6.33
Norethindrone	상단(%)	96.14	8.44(27)	92.80	99.48
	하단(%)	2.38	5.02(27)	0.40	4.37
	Hill 기울기	-1.41	0.32(27)	-1.53	-1.28
	LogIC ₅₀ (M)	-5.73	0.27(27)	-5.84	-5.62

* IC₅₀의 범위는 수용체의 K_d 값 및 방사능표지 리간드의 농도에 따라 달라질 수 있다.

표 3-1. 포화도 분석에 사용하는 [³H]-17β-에스트라디올과 수용체의 농도 및 플레이트 배치(사례)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	0.03 nM [³ H]E ₂ + ER			0.06 nM [³ H]E ₂ + ER			0.08 nM [³ H]E ₂ + ER			0.10 nM [³ H]E ₂ + ER			총 결합 (용매)
B	0.30 nM [³ H]E ₂ + ER			0.60 nM [³ H]E ₂ + ER			1.0 nM [³ H]E ₂ + ER			3.0 nM [³ H]E ₂ + ER			
C													
D	0.03 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.03 μM E ₂			0.06 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.06 μM E ₂			0.08 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.08 μM E ₂			0.10 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.10 μM E ₂			비특이성결합
E	0.30 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.30 μM E ₂			0.60 nM [³ H]E ₂ + ER + 0.60 μM E ₂			1.0 nM [³ H]E ₂ + ER + 1.0 μM E ₂			3.0 nM [³ H]E ₂ + ER + 3.0 μM E ₂			
F													
G	0.03 nM [³ H]E ₂ (총 dpms)			0.06 nM [³ H]E ₂			0.08 nM [³ H]E ₂			0.10 nM [³ H]E ₂			총 dpms*
H	0.30 nM [³ H]E ₂			0.60 nM [³ H]E ₂			1.0 nM [³ H]E ₂			3.0 nM [³ H]E ₂			

* dpms(disintegrations per minute): 분 당 분해

표 3-2. 경쟁적 결합 분석에 사용하는 대조물질의 농도 및 플레이트 배치(사례)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB			TB			NSB			NSB		
B	E ₂ (1 × 10 ⁻⁷)			E ₂ (1 × 10 ⁻⁸)			E ₂ (1 × 10 ^{-8.5})			E ₂ (1 × 10 ⁻⁹)		
C	E ₂ (1 × 10 ^{-9.5})			E ₂ (1 × 10 ⁻¹⁰)			E ₂ (1 × 10 ⁻¹¹)			무처리군		
D	NE (1 × 10 ^{-4.5})			NE (1 × 10 ⁻⁵)			NE (1 × 10 ^{-5.5})			NE (1 × 10 ⁻⁶)		
E	NE (1 × 10 ^{-6.5})			NE (1 × 10 ⁻⁷)			NE (1 × 10 ^{-7.5})			NE (1 × 10 ^{-8.5})		
F	OTES (1 × 10 ⁻³)			OTES (1 × 10 ⁻⁴)			OTES (1 × 10 ⁻⁵)			OTES (1 × 10 ⁻⁶)		
G	OTES (1 × 10 ⁻⁷)			OTES (1 × 10 ⁻⁸)			OTES (1 × 10 ⁻⁹)			OTES (1 × 10 ⁻¹⁰)		
H	무처리군 (for hot)			무처리군 (for hot)			완충액 대조군			완충액 대조군		

TB; total binding, NSB; non-specific binding

표 3-3. 경쟁적 결합 분석에서 시험물질의 농도 및 플레이트 배치(사례)

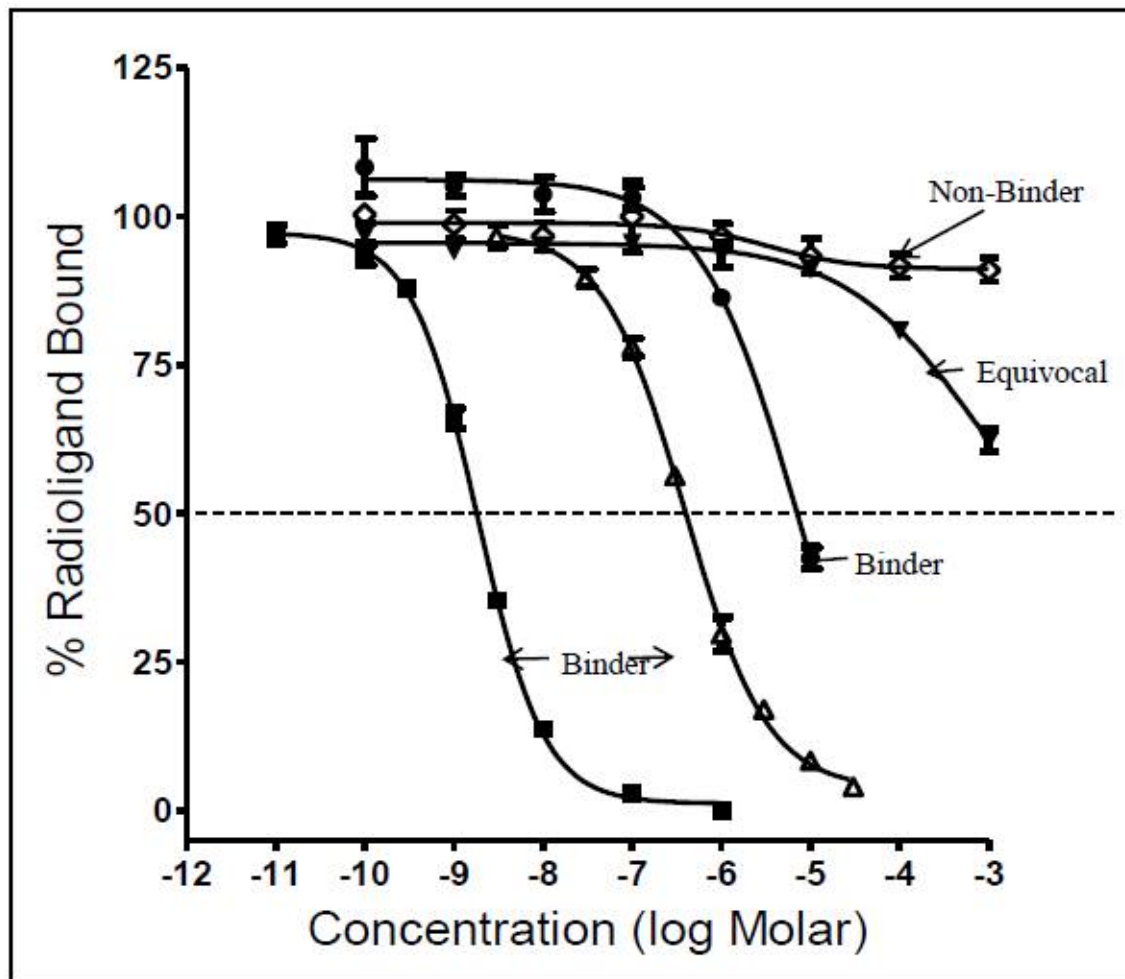
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	TB			TB			NSB			NSB		
B	시험물질 1 (1×10^{-3})			시험물질 1 (1×10^{-4})			시험물질 1 (1×10^{-5})			시험물질 1 (1×10^{-6})		
C	시험물질 1 (1×10^{-7})			시험물질 1 (1×10^{-8})			시험물질 1 (1×10^{-9})			시험물질 1 (1×10^{-10})		
D	시험물질 2 (1×10^{-3})			시험물질 2 (1×10^{-4})			시험물질 2 (1×10^{-5})			시험물질 2 (1×10^{-6})		
E	시험물질 2 (1×10^{-7})			시험물질 2 (1×10^{-8})			시험물질 2 (1×10^{-9})			시험물질 2 (1×10^{-10})		
F	시험물질 3 (1×10^{-3})			시험물질 3 (1×10^{-4})			시험물질 3 (1×10^{-5})			시험물질 3 (1×10^{-6})		
G	시험물질 3 (1×10^{-7})			시험물질 3 (1×10^{-8})			시험물질 3 (1×10^{-9})			시험물질 3 (1×10^{-10})		
H	NE (IC_{50})			NE ($1 \times 10^{-4.5}$)			E ₂ (IC_{50})			E ₂ (1×10^{-7})		

TB; total binding, NSB; non-specific binding

표 4. 시험물질의 결합률에 따른 결과 값 및 분류

각 시험결과에 해당하는 수치	
분류	수치
결합물질	2
결정보류	1
비결합물질	0
시험결과 수치들의 평균으로 분류	
분류	수치
결합물질	평균 ≥ 1.5
결정보류	$0.5 \leq \text{평균} < 1.5$
비결합물질	평균 < 0.5

그림 1. 경쟁적 결합 곡선에 따른 시험물질의 분류(사례)



Binder: 결합물질

Non-Binder: 비결합물질

Equivocal: 결정보류

제66항 유기인계 화합물의 지발성 신경독성시험: 급성경구독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 성숙한 산란용 암탉에 시험물질을 1 회 경구 투여 한 후 행동변화, 운동실조, 마비 등 지발성 신경독성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 급성 지발성 신경독성

시험물질을 1 회 투여하였을 때 나타나는 지발성 운동실조, 척수 및 말초신경에서의 말단 축삭병증, 신경조직에서 신경독성 에스터라아제의 억제 및 노화와 연관된 증후군

2.2 유기인계 화합물

다음에 해당하는 각 물질을 포함

- organophosphorus esters 또는 thioesters
- organophosphoric 또는 organophosphonic의 무수물
- organophosphoramidic acids 또는 phosphorothioic, phosphonothioic 관련 물질
- phosphorothioamidic acids
- 기타 위 유기인계에서 보이는 수준의 신경독성을 유발할 수 있는 다른 물질

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물의 종 및 성

8 개월 ~ 12 개월 된 성숙한 산란용 암탉(*Gallus gallus domesticus*)을 사용하며, 표준크기의 일반적인 계통 및 품종을 선정한다. 이전에 다른 시험에 사용된 적이 없고 건강하여야 하며, 시험개시 전 5 일 이상 실험실 조건에 순화시켜야 한다.

1.1.2 사육 및 급이조건

자유롭게 움직이고 보행관찰을 쉽게 할 수 있도록 충분한 공간에서 사육하여야 한다. 조명은 인공조명으로 하며 12 시간 광주기 상태로 유지한다. 적절한 사료를 제공하며 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

1.1.3 동물군 및 마리 수

- (1) 투여군 이외에 용매 대조군과 양성 대조군을 두어야 한다. 양성 대조물질로는 tri-o-cresylphosphate (TOPC)를 사용한다.
- (2) 투여군과 용매 대조군에서는 최소 12 마리로 구성하며 6 마리는 생화학적 검사에 사용하고, 6 마리는 21 일 동안 생존하는 것으로서 관찰 및 조직병리학적 검사에 사용한다. 양성 대조군의 경우에는 최소 6 마리로 구성하며 3 마리는 생화학적 검사에, 3 마리는 조직병리학적 검사에 사용한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 암탉에 1 회 경구로 투여한 후 일부 동물에 대해서는 24 시간 및 48 시간에 생화학적 검사를 실시하고, 일부 동물에 대해서는 21 일 동안 행동이상, 운동신경마비 등 지발성 신경독성을 관찰한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여경로 및 방법

시험물질은 보통 위관투여법, 젤라틴 캡슐 또는 그에 준하는 방법을 사용하여 경구적으로 투여한다. 고체는 가능한 용해시켜 투여하며 물 이외의 용매를 사용하는 경우 용매에 의한 영향을 사전에 인지하여야 한다.

2.2.2 용량 선정

본시험에서 사용할 용량으로서 사망이 일어나지 않는 최고용량을 선정하기 위해 예비시험을 실시하며, 예비시험에서는 일부 개체가 사망하는 용량을 포함할 수 있다. 급성콜린성 영향으로 인한 사망을 예방하기 위해 아트로핀을 투여하거나 지발성 신경독성반응을 저해하지 않는 다른 보호제를 사용할 수 있다.

2.3 한계시험

구조상관성 시험자료 등의 자료에 근거하여 독성영향이 발현되지 않을 것으로 판단되고 2,000 mg/kg 용량에서 독성영향이 관찰되지 않은 경우에는 이 보다 더 높은 용량을 사용하여 시험할 필요는 없다.

2.4 관찰

- (1) 관찰은 투여 직후부터 시작해야 한다. 모든 동물에 대해 처음 2 일 동안 여러 번 주의깊게 관찰해야 하며, 이후 21 일 동안 또는 일정에 따라 치사시킬 때까지 적어도 하루에 한 번 또는 일정에 따라 치사시킬 때까지 신중히 관찰해야 한다.
- (2) 발병 시기, 유형, 중증도 및 행동 이상의 기간을 포함하여 모든 독성징후를 기록해야 한다. 운동 실조는 그 정도에 따라 구분하여 측정하며 마비상태가 발생할 경우에는 기록하여야 한다.
- (3) 조직병리 검사 대상을 선별하기 위해 최소한 일주일에 두 번은 축사 밖으로 이동하여 사다리 오르기와 같은 강제적인 운동을 시킨다. 빈사상태의 암탉은 치사시킨 후 육안 부검을 실시한다.

2.5 체중

모든 동물에 대해 시험물질을 투여하기 직전에 체중을 측정하며 이후 적어도 일주일에 한 번은 측정하여야 한다.

2.6 생화학적 검사

- (1) 일반적으로 양성 대조군 3 마리는 투여 후 24 시간, 대조군과 각 투여군은 투여 후 24 시간 및 48 시간에 각각 3 마리씩을 무작위로 선발하여 치사시키고, 뇌와 요추 척수에서의 신경병리 에스테라아제(Neuropathy Target Esterase, NTE) 활성을 측정한다. 좌골신경조직에서의 NTE 활성을 측정할 수도 있다.
- (2) 아세틸콜린 에스테라아제(AChE, acetylcholine esterase)의 활성을 분석할 경우에는 *in vivo* 상태에서 AChE가 자발적으로 재활성화될 수 있으며 이 경우에는 AChE 활성을 억제하는 시험물질의 효능이 과소평가될 수 있다.

2.7 조직병리학적 검사

- (1) 모든 동물에 대해 뇌와 척수의 외관을 포함하여 육안 부검을 실시한다.
- (2) 생화학적 검사에 사용되지 않은 동물의 신경조직에 대해 myelin 염색이나 축삭 특이적인 염색을 실시한 후 조직병리학적 검사를 수행한다. 검사대상은 소뇌(중축 중양 부분), 연수, 척수 및 말초신경을 포함하며, 척수는 상부경추 부분, 흉부 중양 부분 및 요추-천골 부위를 포함한다. 경골 신경의 원위부와 비복근 부분까지의 신경 분지 및 좌골신경 부분도 포함한다.

Ⅲ. 시험결과의 보고

1. 결과의 처리

- (1) 투여군 및 대조군에서 발병률, 중증도 및 행동, 생화학, 조직병리학적 영향과 관찰된 다른 모든 영향과의 상관관계를 통해서 평가한다.
- (2) 수치 결과는 적절하고 일반적으로 수용 가능한 통계 방법에 의해 평가되어야 하며, 통계 방법은 시험계획 과정 중에 미리 선정한다.
- (3) 시험 자료는 개별 동물마다 제시하도록 하되 시험을 시작할 당시의 동물 수, 병변, 행동변화, 생화학적 영향, 병변의 유형이나 중증도, 또는 영향을 보이는 동물의 비율 등을 표로 요약하여 제시한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 표시한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질

물리적 성질(이성질화, 순도 및 물리화학적 특성 포함), 식별 자료

2.4 용매(해당되는 경우)

물 이외의 경우 용매 선택에 대한 타당성

2.5 시험동물

사용된 계통, 동물의 수와 주령 또는 월령, 구입처, 사육 조건, 시험 시작 시 개체별 체중

2.6 시험조건

- (1) 시험물질 준비, 안정성 및 균질성에 대한 세부 사항(적절한 경우)
- (2) 시험물질 투여에 대한 세부사항
- (3) 사료 및 음용수에 대한 세부사항

- (4) 용량 선정에 대한 근거
- (5) 용매, 부피 및 물리적 형태 등을 포함한 투여 용법의 세부사항
- (6) 보호제 및 투여 방법의 세부사항

2.7 결과

- (1) 체중
- (2) 사망률을 포함한 군 별 독성 반응 자료
- (3) 일반상태관찰의 변화와 종류, 정도 및 기간
- (4) 생화학적 검사와 소견의 상세기술
- (5) 부검 소견
- (6) 모든 조직병리학적 소견에 대한 자세한 설명
- (7) 통계처리

2.8 결과에 대한 토의사항

2.9 결론

제67항 유기인계 화합물의 지발성 신경독성시험: 28일 반복투여독성시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 성숙한 산란용 암탉에 시험물질을 28일 반복 경구 투여한 후 행동변화, 운동실조, 마비 등 지발성 신경독성을 평가하는 것을 목적으로 한다.

2. 정의

2.1 지발성 신경독성

시험물질 투여 후 나타나는 지발성 운동실조, 척수 및 말초신경에서의 말단 축삭 병증, 신경조직에서 신경병리 에스테라아제의 억제 및 노화와 연관된 증후군

2.2 유기인계 화합물

다음에 해당하는 각 물질을 포함

- organophosphorus esters 또는 thioesters
- organophosphoric 또는 organophosphonic의 무수물
- organophosphoramidic acids 또는 phosphorothioic, phosphonothioic 관련 물질
- phosphorothioamidic acids
- 기타 위 유기인계에서 보이는 수준의 신경독성을 유발할 수 있는 다른 물질

II. 시험

1. 시험의 준비

1.1 시험동물

1.1.1 동물의 종 및 성

산란용으로 키우는 8 개월 ~ 12 개월의 성숙한 암탉(*Gallus gallus domesticus*)을 사용하며, 표준크기의 일반적인 계통 및 품종을 선정한다. 이전에 시험에 사용한 적이 없고 건강하여야 하며, 시험개시 전 5 일 이상 실험실 조건에 순화시켜야 한다.

1.1.2 사육 및 급이조건

자유롭게 움직이고 보행관찰을 쉽게 할 수 있도록 충분한 공간에서 사육하여야 한다. 조명은 인공조명으로 하며 12 시간 광주기 상태로 유지한다. 적절한 사료를 제공하며 음용수는 자유로이 섭취할 수 있도록 공급한다.

1.1.3 동물군 및 마리 수

- (1) 최소 3 용량의 투여군과 용매 대조군을 둔다.
- (2) 각 투여군과 용매 대조군은 최소 12 마리로 구성하며 6 마리는 생화학적 검사에 사용하고(3 마리씩 서로 다른 시점에 실시), 6 마리는 관찰 및 조직병리학적 검사에 사용한다. 용매 대조군은 시험물질의 투여를 제외하고는 투여군과 동일한 방식으로 처리한다.

2. 시험방법

2.1 원리

시험물질을 암탉에 1 일 1 회씩 28 일 동안 경구로 투여하고 일부 동물에 대해서는 마지막 투여 후 24 시간 및 48 시간에 생화학적 검사를 실시하며, 일부 동물에 대해서는 마지막 투여 후 2 주 이내에 신경조직의 병리학적 검사를 실시한다. 동물들의 행동이상, 운동장애, 신경마비 등에 대해서는 매일 관찰하며 마지막 투여 후 14 일 까지 관찰한다.

2.2 시험물질

2.2.1 투여경로 및 방법

시험물질은 주당 7 일간 매일 경구로 투여하며 위관투여법 또는 젤라틴 캡슐을 사용한다. 고체는 가능한 용해시켜 투여하며 물 이외의 용매를 사용하는 경우 용매에 의한 영향을 사전에 인지하여야 한다.

2.2.2 용량 선정

급성 지발성 신경독성시험의 결과와 기존의 다른 독성시험 또는 독성동태시험의 결과 등을 바탕으로 용량을 선정하되 최고용량에서는 사망이나 극심한 고통이 수반되지 않은 용량이어야 한다. 이후 용량-반응성 평가 및 무영향관찰용량을 도출할 수 있도록 적절한 내림차순으로 저용량을 선정하여야 한다.

2.3 한계시험

구조-활성 상관성 시험자료 등의 자료에 근거하여 독성영향이 발현되지 않을 것으로 판단되고 1,000 mg/kg 용량에서 독성영향이 관찰되지 않은 경우에는 이보다 더 높은 용량을 사용하여 시험할 필요는 없다.

2.4 관찰

- (1) 관찰은 투여 직후부터 시작해야 한다. 모든 동물에 대해 28 일 동안, 그리고 마지막 투여 후 14 일 동안 적어도 하루에 한 번 또는 일정에 따라 치사시킬 때까지 신중히 관찰해야 한다.
- (2) 발병 시기, 유형, 중증도 및 행동 이상의 기간을 포함하여 모든 독성증상을 기록해야 한다. 운동 실조는 그 정도에 따라 구분하여 측정하며 마비상태가 발생할 경우에는 기록을 하여야 한다.
- (3) 조직병리 검사 대상을 선별하기 위해 최소한 일주일에 두 번은 축사 밖으로 이동하여 사다리 오르기와 같은 강제적인 운동을 시킨다. 빈사상태의 암탉은 치사시킨 후 일반 부검을 실시한다.

2.5 체중

모든 동물에 대해 시험물질을 투여하기 직전에 체중을 측정하며 이후 일주일에 최소 한 번은 측정해야 한다.

2.6 생화학적 검사

- (1) 대조군과 각 투여군은 투여 후 24 시간 및 48 시간에 각각 3 마리씩을 무작위로 선별하여 치사시키고, 뇌와 요추 척수에서의 신경병리 에스테라아제 (Neurophaty Target Esterase, NTE) 활성을 측정한다. 좌골신경조직에서의 NTE 활성을 측정할 수도 있다. 치사시간은 급성 지발성 신경독성시험의 결과나 기타 다른 시험의 결과를 근거로 변경할 수 있다.
- (2) 아세틸콜린 에스테라아제(AChE; acetylcholine esterase)의 활성을 분석할 경우에는 *in vivo* 상태에서 AChE가 자발적으로 재활성화될 수 있으며 이 경우에는 AChE 활성을 억제하는 시험물질의 효능이 과소평가될 수 있다.

2.7 조직병리학적 검사

- (1) 사망동물, 빈사상태의 동물을 포함한 모든 동물에 대해 뇌와 척수의 외관을 포함하여 일반 부검을 실시한다.
- (2) 생화학적 검사에 사용되지 않은 동물의 신경조직에 대해 myelin 염색이나 축삭 특이적인 염색을 실시한 후 조직병리학적 검사를 수행한다. 검사대상은 소뇌(중축 중양 부분), 연수, 척수 및 말초신경을 포함하며, 척수는 상부경추 부분, 흉부 중양 부분 및 요추-천골 부위를 포함한다. 경골 신경의 원위부와 비복근 부분까지의 신경 분지 및 좌골신경 부분도 포함한다.
- (3) 우선 최고 용량군과 대조군에 대해 먼저 실시하고 최고 용량군에서 시험물질의 영향이 있을 경우 중간 용량군 및 저용량 군에 대해서도 실시한다.

III. 시험결과의 보고

1. 결과의 처리

- (1) 투여군 및 대조군에서 발병률, 중증도 및 행동, 생화학, 조직병리학적 영향과 관찰된 다른 모든 영향과의 상관관계를 통해서 평가한다.
- (2) 수치 결과는 적절하고 일반적으로 수용 가능한 통계 방법에 의해 평가되어야 하며, 통계 방법은 시험계획 과정 중에 미리 선정한다.
- (3) 시험 자료는 개별 동물마다 제시하도록 하되 시험을 시작할 당시의 동물 수, 병변, 행동변화, 생화학적 영향, 병변의 유형이나 중증도, 또는 영향을 보이는 동물의 비율 등을 표로 요약하여 제시한다.

2. 시험결과의 보고

시험보고서는 다음의 항목을 표시한다.

2.1 시험기관의 명칭 및 소재지

2.2 시험책임자 및 담당자 성명

2.3 시험물질

물리적 성질(이성질화, 순도 및 물리화학적 특성 포함), 식별 자료

2.4 용매(해당되는 경우)

물 이외의 경우 용매 선택에 대한 타당성

2.5 시험동물

사용된 계통, 동물의 수와 주령 또는 월령, 구입처, 사육 조건, 시험 시작 시 개체별 체중

2.6 시험 조건

- (1) 시험물질 준비, 안정성 및 균질성에 대한 세부 사항 (적절한 경우)
- (2) 시험물질 투여에 대한 세부사항
- (3) 사료 및 음용수에 대한 세부사항
- (4) 용량 선정에 대한 근거
- (5) 용매, 부피 및 물리적 형태 등을 포함한 투여 용법의 세부사항

2.7 결과

- (1) 체중
- (2) 사망률을 포함한 군 별 독성 반응 자료, 무영향관찰용량
- (3) 일반상태관찰의 변화와 종류, 정도 및 기간
- (4) 생화학적 검사와 소견의 상세기술
- (5) 부검 소견
- (6) 모든 조직병리학적 소견에 대한 자세한 설명
- (7) 통계처리

2.8 결과에 대한 토의사항

2.9 결론

제68항 비트리젤(Vitrigel)을 이용한 눈 자극성 시험

I. 개요

1. 목적

이 시험은 비트리젤(Vitrigel)을 이용하여 시험물질에 의한 인체각막상피(hCE, Human Corneal Epithelium) 세포주의 투과상피전기저항(TEER, Trans Epithelial Electrical Resistance) 변화를 측정함으로써 각막 상피의 장벽 기능 손상을 평가하고, 이를 바탕으로 눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질(No Category)을 확인하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 눈 비자극성 물질

눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질(비자극성물질, No Category)로서 GHS 카테고리 1, 2, 2A 및 2B에 해당하지 않는 물질

2.2. 투과상피전기저항(TEER, Trans Epithelial Electrical Resistance)

상피 또는 상피 세포 층의 전기 저항을 가리키며, 각막 상피 접합의 완전성을 평가하기 위한 측정 값

2.3. 콜라겐 비트리젤막(CVM, Collagen Vitrigel Membrane)

생체 내 결합 조직을 모델링하는 고밀도 콜라겐 섬유로 구성된 막. 투명성이 뛰어나고 분자량이 높은 단백질의 투과성도 우수하여 이상적인 세포 배양 환경을 제공함

II. 시험

1. 원리

본 시험법은 콜라겐 비트리젤막(CVM) 챔버 안에 설치된 인체각막상피(hCE) 모델을 이용하여 각막 상피의 장벽 기능 손상을 평가하고, 이를 바탕으로 눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는(비자극성, No category) 화학물질을 확인하

는 생체 외(*in vitro*) 시험법이다. 시험물질의 눈 자극성은 노출시간에 따른 투과상 피전기저항(TEER) 값의 변화를 분석함으로써 예측한다.

2. 고려사항

비트리젤을 이용한 눈 자극성 시험법은 강한 휘발성의 시험물질, 포르마잔 염료(Formazan dye)와 동일한 파장 범위의 빛을 흡수하는 시험물질, 테트라졸륨 염료(Tetrazolium dye)를 직접적으로 환원시키는 시험물질에 모두 적용할 수 있으나, 고체 시험물질이나 산성 시험물질 [2.5 % (w/v)에서 pH ≤ 5인 경우]에는 적용할 수 없다. 또한, 이 시험법에 의해서는 UN GHS 카테고리 2 (눈 자극/가역적 눈 영향)와 카테고리 1 (눈 손상/비가역적 눈 영향) 사이의 구별 및 카테고리 2A (눈 자극)와 카테고리 2B (약한 눈 자극) 사이의 구별이 불가하므로, 이러한 경우 다른 생체 외 시험법을 사용한 추가 시험이 필요하다.

3. 시험의 준비

3.1. 인체각막상피(hCE) 세포주 배양

불멸화된 인체각막상피 세포는 5 % 불활성화된 태아 소 혈청(Fetal bovine serum), 5 μ g/mL 재조합 인간 인슐린, 10 ng/mL 재조합 인간 표피 성장 인자, 0.5 % DMSO (DiMethylSulfOxide), 100 units/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지와 영양 혼합물질 F-12의 1 : 1 혼합 배양배지를 사용하여 5 % CO₂ 및 37 ° C 조건에서 배양한다. 박테리아, 바이러스, 미코플라스마 및 곰팡이에 의한 오염이 없어야 한다.

3.2. 콜라겐 비트리젤막(CVM) 챔버의 설치

콜라겐 Xerogel 멤브레인 챔버를 12-웰 플레이트의 웰 안쪽에 설치하고, 사용 직전에 챔버 바깥쪽과 안쪽에 각각 1.5 mL, 0.5 mL의 배양배지를 첨가한 후 Xerogel이 비트리젤로 전환되도록 10 분간 기다린다. 만약 다른 챔버를 사용할 경우에는, 챔버 안에 들어가는 hCE가 적절한 TEER 값을 보여야 한다.

3.3. 인체각막상피(hCE) 모델 제작

3.3.1. CVM 내 hCE 세포 배양

챔버 바깥쪽 배지를 신선한 1.5 mL 배지로 교체하고 챔버 안쪽 배지를 조심스럽게 제거한 후 세포 현탁액 0.5 mL (1.2×10^5 세포/mL 농도)를 챔버의 CVM 위에 부어준다. 2일간 배양 후 챔버 안쪽 배지를 조심스럽게 제거하고 챔버 바깥쪽 배지는 신선한 배지로 교체한다. 이 상태로 세포를 공기와 액체의 경계면에서 4일간 더 배양한다.

3.3.2. 인체각막상피(hCE) 품질 확인

TEER 값을 측정하여 hCE 모델의 장벽 기능을 확인한다. TEER 측정시스템의 긴 전극과 짧은 전극을 각각 챔버 바깥쪽과 안쪽 배지에 넣고 TEER 값을 측정하여 그 값이 $140 \, \Omega \cdot \text{cm}^2 \sim 220 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ 범위에 해당하면 해당 모델은 이 시험에 적합한 것으로 본다.

3.4. hCE 모델의 TEER 값 측정

TEER 값은 CVM 챔버안에 hCE가 들어있을 때(Rmodel)와 들어있지 않을 때(Rblank)의 전기 저항값을 고려하여 아래의 식에 따라 계산한다.

$\begin{aligned} &\text{hCE 모델 TEER 값 } (\Omega \cdot \text{cm}^2) \\ &= \{R_{\text{model}}(\Omega) - R_{\text{blank}}(\Omega)\} \times \text{유효 표면 면적}(\text{cm}^2) \end{aligned}$

또한, 시험 측정 전에 TEER 측정 시스템의 감도를 확인하여야 하며 이를 위해 0.45 %, 0.9 % 두 가지 농도의 염화나트륨 수용액의 TEER 값을 측정하고 그 차이가 $60 \, \Omega \cdot \text{cm}^2$ 이상이 되면 TEER 측정 시스템이 정상 작동하는 것으로 본다.

3.5. 대조물질 조제

음성대조물질로는 생리식염수, 양성대조물질로는 염화벤잘코늄 클로라이드 (Benzalkonium chloride), hCE의 품질 확인을 위한 표준 대조물질로는 에탄올을 사용한다. 대조 물질의 최종농도는 2.5 % (w/v)이다.

3.6. 시험물질 조제

시험물질은 최종 농도 2.5 % (w/v)가 되도록 조제한다. 만약 잘 녹지 않을 경우, 아래의 방법 중 하나를 선택하여 수행한다.

- a) 최대 1 분간 볼텍스 믹서(Vortex mixer)를 이용하여 혼합한다.
- b) 최대 20 분간 초음파를 이용하여 분산한다.
- c) 최고 70 °C 까지 가열한다.

pH 시험지를 이용하여 배지중의 pH를 측정한 후 pH 값이 5 이하일 경우 그 시험 물질에 대해서는 시험하지 않는다.

3.7. 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 생산하기 위해서는 우선 이 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이를 위해서는 표 1에 열거된 10 종의 숙련도 물질에 대해 시험하고 그 결과 값이 표 1에 제시된 분류 내용과 일치하는 지를 확인한다. 숙련도 시험에 아래 물질을 사용할 수 없는 경우에는 적절한 생체 내 및 생체 외 시험 결과가 존재하는 다른 물질로 대체할 수 있다.

표 1. 비트리젤을 이용한 눈 자극성 시험에 대한 숙련도 시험의 물질 및 결과 분류

번호	UN GHS 카테고리 숙련도 물질	분류내용
생체 내 UN GHS 카테고리 1		
1	3-(2-Aminoethylamino)propyltrimethoxysilane (CAS 번호 1760-24-3)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
2	Tetraethylene glycol (CAS 번호 17831-71-9)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
3	Butanol (CAS 번호 71-36-3)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
생체 내 UN GHS 카테고리 2A		
4	gamma-Butyrolactone (CAS 번호 96-48-0)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
5	Cyclopentanol (CAS 번호 96-41-3)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
생체 내 UN GHS 카테고리 2B		
6	2-Methyl-1-pentanol (CAS 번호 105-30-6)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
7	Ethyl-2-methylacetoacetate (CAS 번호 609-14-3)	판정 보류 ¹⁾ (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
생체 내 UN GHS 카테고리 없음		
8	<i>iso</i> -Octyl acrylate (CAS 번호 29590-42-9)	비자극성 물질 ²⁾ (눈 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)
9	2-(<i>n</i> -Dodecylthio) ethanol (CAS 번호 1462-55-1)	비자극성 물질 ²⁾ (눈 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)
10	<i>iso</i> -Octylthioglycolate (CAS 번호 25103-09-7)	비자극성 물질 ²⁾ (눈 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)

¹⁾판정 보류: 분류를 위해서는 IATA 지침서에 따라 추가적인 정보를 확보하여야 하며 이러한 물질은 UN GHS 분류상으로는 카테고리1, 카테고리 2A 또는 2B에 속하는 물질임

²⁾비자극성물질: GHS 분류상으로 ‘심각한 눈손상’ 또는 ‘눈자극성’에 대한 분류가 필요하지 않은 물질임

4. 시험 방법

4.1. 대조물질 및 시험물질의 적용

사전에 품질을 확인한 후 적격한 것으로 확인된 hCE 모델을 시험에 사용한다. 챔버 안쪽 배지를 0.5 mL 시험물질로 교체한 후부터 3 분 동안 10 초 간격으로 Rmodel 값을 측정한다. 대조물질 및 시험물질 각각에 대해 최소 3 개 이상의 hCE 모델을 사용하여 한다. 재현성을 확보하기 위해서 대조물질 또는 시험물질 노출 직후 2 초 ~ 5 초 사이에 TEER 값을 측정하여야 하며 측정시간 동안 시험물질 및 hCE 모델은 $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 를 유지하여야 한다.

4.2. 실험결과 값의 기준 및 분류

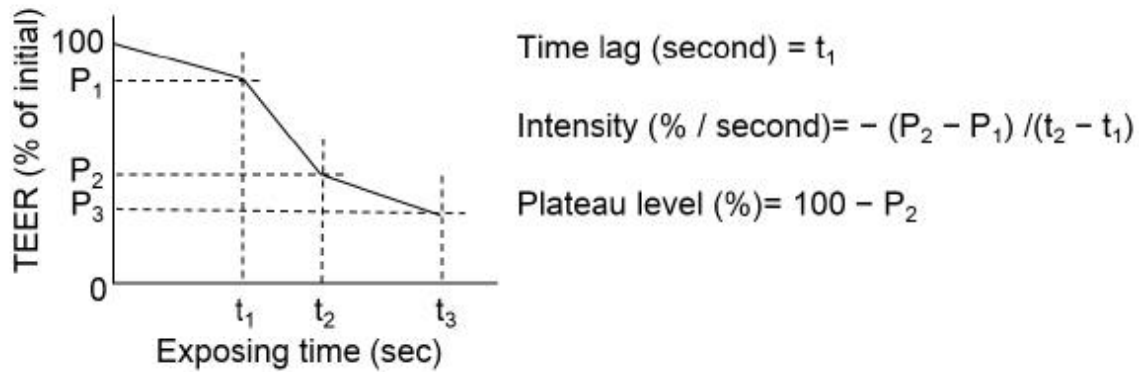
3 회 시험의 평균 TEER 값을 다음의 3 가지 지표를 이용하여 분석한다.

- a) 지연시간(초) (Time lag) : (t_1)
- b) 강도(%/초) (Intensity) : ($-(P_2 - P_1) / [t_2 - t_1]$)
- c) 안정기 수준(%) (Plateau level) : ($100 - P_2$)

측정된 TEER 값의 지표 중 지연시간(t_1)이 180 초를 초과하고, 강도($-(P_2 - P_1) / [t_2 - t_1]$)가 0.05 %/초 미만이며 안정기 수준($100 - P_2$)이 5 % 이하인 조건을 모두 만족할 때 ‘비자극성 물질’로 판단하며, 그 외의 모든 경우는 ‘판정 보류’로 분류한다. (표 2, 그림 1 참조)

표 2. UN GHS분류기준에 따른 실험결과 값의 기준 및 분류 내용

기준	분류 내용
지연시간 180 초 이하 또는, 강도 0.05 %/초 이상 또는, 안정기 수준 5.0 % 초과	판정 보류 (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
지연시간 180 초 초과 그리고, 강도 0.05 %/초 미만 그리고, 안정기 수준 5.0 % 이하	비자극성 물질 (눈 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)



t_1 (초); 프로파일이 $0 \geq dP/dT > -0.03$ %/초로 유지되는 최대 시간

t_2 (초); 프로파일이 $dP/dT \leq -0.03$ %/초로 유지된 후 $0 \geq dP (P_3 - P_2)/dT (t_3 - t_2) > -0.03$ %/초로 유지되는 초기 시간

t_3 (초); 안정기 수준은 30 초 동안 프로파일에 의해 평가되므로 $t_2 + 30$ 초

P_1 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t_1 의 TEER 값의 백분율

P_2 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t_2 의 TEER 값의 백분율

P_3 (%); 0 초의 TEER 값에 대한 t_3 의 TEER 값의 백분율

dP/dT ; 시간변화 (dT)에 대한 P 값 크기의 비

그림 1. hCE 모델에 시험물질을 노출시킨 후 시간경과에 따른 TEER 값의 변화

4.3. 시험의 성립조건

시험은 아래의 4 가지 기준을 모두 만족한 경우에만 성립되는 것으로 판단한다.

- a) 음성대조군의 안정기 수준 5 % 이하
- b) 양성대조군의 안정기 수준 40 % 이상
- c) 표준대조군의 안정기 수준 10 % 이상
- d) 각 시험 물질의 TEER 프로파일 평균 표준 편차 15 % 이하

Ⅲ. 시험결과 및 보고

1. 시험 자료

개별 hCE 모델에서의 TEER 값, 각 지표 값, 분류내용 등을 시험자료로 보고한다.

2. 시험 결과의 보고

시험 보고서에는 다음 정보를 기술하여야 한다.

2.1. 시험물질 및 대조물질

- (1) 단일조성물질 : IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES 또는 InChI 코드, 구조식 등 화학물질의 식별에 필요한 정보
- (2) 다조성물질, UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials) 및 혼합물질 : 성분의 화학적 동일성, 순도, 정량적 발생 및 관련 물리 화학적 특성
- (3) 물리적 상태, pH, 휘발성, 분자량, 화학적 분류 및 추가 관련 물리 화학적 특성
- (4) 불순물의 순도 및 화학적 특성
- (5) 시험물질의 전처리(예 : 가온 등, 해당되는 경우)
- (6) 보관 조건 및 안정성

2.2. 시험 조건 및 방법

- 1) 시험의뢰자, 시험 시설 및 연구 책임자의 이름과 주소
- 2) 시험 방법에 대한 설명
- 3) 시험 절차의 세부 사항
- 4) 세포주, 세포주 공급원, 세포 계대 수, 세포 밀집도
- 5) 시약 공급 업체, 카탈로그 번호 및 로트 번호
- 6) hCE 세포의 계대 배양 시간 및 날짜, 트립신 처리 시간, 세포의 희석 비율
- 7) hCE 모델 준비에 소요된 각 단계별 기간
- 8) TEER 측정 시스템에 대한 QC 점검 자료
- 9) 시험물질 조제 기록
- 10) 시험물질 노출 시험 시작시 hCE 모델의 온도 및 시험 물질 조제 내용
- 11) hCE 모델의 로트 번호
- 12) CO₂ 배양기에서 hCE 모델을 꺼내서 시험 물질에 노출하는데 걸린 시간
- 13) TEER 측정 시스템에 의한 TEER 측정 시작 시간
- 14) 시험물질의 농도(권장되는 농도와 다른 경우)

- 15) 시험물질의 노출시간(권장되는 시간과 다른 경우)
- 16) 각 시험의 실험반복 수 및 각각의 실험에 사용한 hCE 모델의 수
- 17) 시험 절차의 수정 또는 변경 사항에 대한 설명
- 18) 숙련도 물질 시험 결과

2.3. 결과

아래 내용에 대한 사항을 표로 작성한다.

- 각 시험물질 및 대조물질에 대해 시험물질 노출전의 TEER값 및 3 분 동안 노출후의 시간대별 TEER
- 3 가지 지표 값(지연시간, 강도, 안정기 수준)
- 시험물질의 분류 결과

2.4. 토의

2.5. 결론

제69항 활성산소종 측정을 이용한 광반응성 시험(ROS 시험)

I. 개요

1. 목적

이 시험은 빛에 의해 시험물질로부터 유도되는 활성산소종(ROS, Reactive Oxygen Species)을 측정함으로써 시험물질의 잠재적 광반응성을 예측하고 평가하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 광반응성(Photoreactivity)

광자(Photon) 흡수의 결과로 다른 분자와의 반응성을 갖게 되는 화학물질의 성질

2.2. 활성산소종(ROS, Reactive Oxygen Species)

초과산화이온(SA, Superoxide Anion)과 일중항산소(SO, Singlet Oxygen)를 포함하는 활성형의 산소 무리

2.3. 분자흡광계수(MEC, Molar Extinction Coefficient)

특정 분자가 광자를 흡수하는 정도를 나타내는 계수

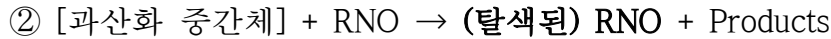
II. 시험

1. 원리

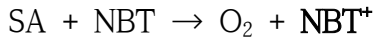
(1) 본 시험법은 분자 내 발색단(Chromophore)의 여기(Excitation)를 유도하는 특정 파장의 광독성 반응에서 여기된 에너지가 산소 분자에 전달되어 생성되는 초과산화이온(SA), 일중항산소(SO) 등의 활성산소종을 측정함으로써 시험물질의 잠재적 광독성을 예측하는 시험법이다.

(2) SO 생성은 *p*-Nitrosodimethylaniline (RNO)의 탈색 정도를 측정하여 검출한다. 단, SO와 RNO는 화학적으로 반응하지 않으므로, Imidazole 고리 화합물에 의해 SO가 과산화 중간체로 전환된 후 RNO의 탈색을 유도하게 된다.





(3) SA 생성은 NitroBlue Tetrazolium (NBT)의 환원 정도를 측정하여 검출한다. SA는 전자 하나를 전달함으로써 안정한 중간체인 Monoformazan (NBT^{•+})을 생성하며 이를 560 nm에서 분광광도계로 측정한다.



2. 고려사항

시험법을 적용하기 전에 시험물질의 자외선-가시광선 흡수 스펙트럼을 확인하고, 만약 제시된 MEC 값이 1,000 L•mol⁻¹•cm⁻¹ 이하일 경우에는 추가적인 시험을 할 필요가 없다. 이 시험법에서 음성으로 판정된 시험물질은 생체 내(In vivo) 시험 시스템에서 음성일 가능성이 있지만, 양성으로 판정된 물질이 생체 내에서 양성일지를 결정하기 위해서는 추가 시험이 필요할 수 있다. 아스코르브산이나 피부 미백 화장품 성분과 같은 환원 시약들은 ROS 측정 과정을 방해할 수 있으므로 주의한다.

3. 시험의 준비

3.1. 태양광 시뮬레이터(Solar simulator)

실제 태양광을 시험에 사용할 경우, 위치나 시간의 차이에 따른 광반응성의 차이가 우려되기 때문에 태양광 시뮬레이터가 사용된다. UVC 파장은 줄이고, 가능한 한 실외 태양광과 유사한 광도를 유지하기 위해 권장되는 실험조건은 아래와 같다. 단, ROS 생성은 온도에 의해 영향을 받기 때문에 태양광 시뮬레이터의 표준 설정 온도는 25 °C로 설정하며, 광조사 기간 중 허용 온도는 20 °C ~ 29 °C 범위 이다.

1) 290 nm 미만의 UV 파장을 줄이기 위한 필터가 부착된 경우(Suntest CPS/CPS+, Atlas)

① 에너지조사 : 1 시간 동안 1.8 mW/cm² ~ 2.2 mW/cm²

② UVA의 조사 강도 : 6.5 J/cm² ~ 7.9 J/cm²

2) 300 nm 미만의 UV 파장을 줄이기 위한 필터가 부착된 경우(SXL-2500V2, Seric)

① 에너지 조사 : 1 시간 동안 3.0 mW/cm² ~ 5.0 mW/cm²

② UVA의 조사 강도 : 11 J/cm² ~ 18 J/cm²

3.2. 석영 반응 용기(Quartz reaction container)

자외선이 플라스틱 뚜껑을 통과하는 동안 조사량이 감소하거나, 광조사 과정에서 반응 혼합물질이 증발되는 것을 막기 위해 그림 1과 같은 석영 반응 용기가 사용된다.

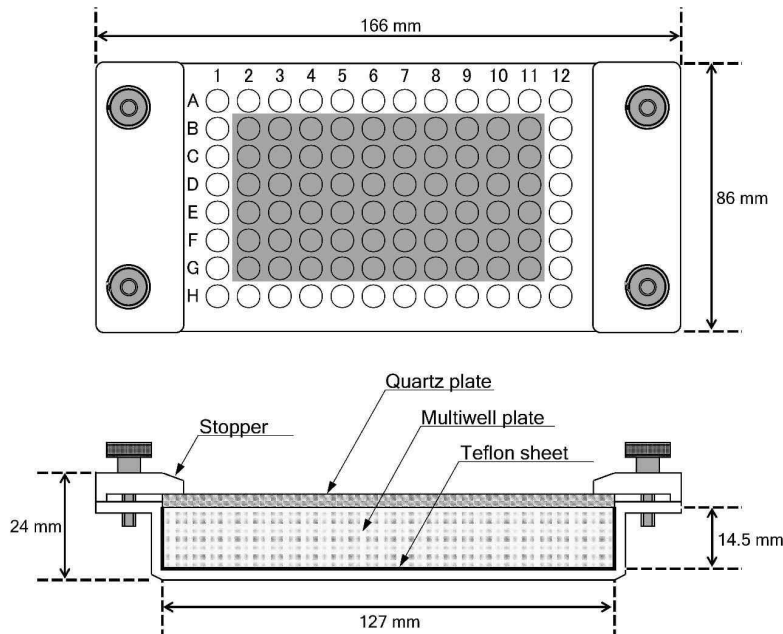


그림 1. 석영 반응 용기의 모식도

3.3. 시약

모든 시약은 조제 후 한 달 이내에 사용하여야 하며 사용 직전에 초음파 처리하여야 한다. 시약별 조제 방법은 다음과 같다.

1) 20 mM Sodium Phosphate Buffer (NaPB), pH 7.4

: 593 mg의 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (CAS 번호 13472-35-0) 및 5.8 g의 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (CAS 번호 10039-32-4)를 900 mL의 정제수에 첨가하고, HCl을 이용하여 pH를 7.4로 맞춘 후 정제수를 추가하여 1L로 만들어 냉장고나 실온에 보관한다.

2) 0.2 mM *p*-Nitrosodimethylaniline (RNO, CAS 번호 138-89-6)

: 3 mg의 RNO를 100 mL의 20 mM NaPB에 녹인 후 차광하여 냉장고에 보관한다.

3) 0.2 mM Imidazole (CAS 번호 288-32-4)

: 13.6 mg의 Imidazole을 10 mL의 20 mM NaPB에 녹이고, 20 mM NaPB를 이용하여 100 배 희석한 후 차광하여 냉장고에 보관한다.

4) 0.4 mM NitroBlue Tetrazolium chloride (NBT, CAS No. 298-83-9)

: 32.7 mg의 NBT을 100 mL의 20 mM NaPB에 녹인 후 차광하여 냉장고에 보관한다.

3.4. 시험물질

(1) 시험물질의 최종 농도는 200 μ M로 하며, 200 μ M 반응액 상에서 침전, 발색 등이 나타날 경우에는 20 μ M로 조제한다. 이 경우, 20 μ M에서 양성 결과를 얻게 된다면 광반응성을 보인다고 판정할 수 있지만, 20 μ M에서 음성 결과를 보인다고 해도 광반응성을 보이지 않는다고 판정할 수는 없다.

(2) 용매는 DMSO (DiMethylSulfOxide)를 사용하되, DMSO에 녹지 않는 물질은 20 mM NaPB를 용매로 사용한다.

3.5. 양성/음성 대조물질

양성대조물질로는 Quinine hydrochloride (CAS 번호 6119-47-7), 음성대조물질로는 Sulisobenzone (CAS 번호 4065-45-6)을 사용한다. 대조물질의 저장액(Stock solution)은 모두 DMSO를 사용하여 10 mM로 조제하고, 튜브에 소분하여 -20 $^{\circ}$ C에서 한 달까지 보관할 수 있다.

3.6. 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 얻기 위해서는 우선 이 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 이 시험에 권장되는 2 종의 태양광 시뮬레이터 (Suntest CPS/CPS+ 또는 SXL-2500V2)에 대해서는 9 개의 숙련도 시험물질(표 1, 1 번 ~ 9 번), 그 외의 태양광 시뮬레이터에 대해서는 17 개의 숙련도 시험물질(표 1, 1 번 ~ 17 번)에 대해 시험하고, SO 및 SA의 측정값이 표 1에 제시된 시험 결과와 일치하여야 한다.

표 1. 숙련도물질 및 시험결과

No	화학물질 명	CAS 번호	시험결과		용매	농도 (μ M)
			SO	SA		
1	<i>p</i> -Aminobenzoic acid	150-13-0	-8~12	-11~7	DMSO	200
2	Benzocaine	94-09-7	-7~9	-7~17	DMSO	200

No	화학물질 명	CAS 번호	시험결과		용매	농도 (μ M)
			SO	SA		
3	Doxycycline hydrochloride	10592-13-9	115~429	230~468	DMSO	200
4	Erythromycin	114-07-8	-15~11	-9~21	DMSO	200
5	Fenofibrate	49562-28-9	77~203	-31~11	DMSO	20
6	L-Histidine	71-00-1	-8~12	8~120	NaPB	200
7	Norfloxacin	70458-96-7	131~271	57~161	DMSO	200
8	8-Methoxy psoralen	298-81-7	31~137	0~126	DMSO	200
9	Octyl salicylate	118-60-5	-5~11	-8~20	DMSO	20
10	Acridine	260-94-6	182~328	121~243	DMSO	200
11	Chlorpromazine hydrochloride	69-09-0	-56~70	66~106	DMSO	200
12	Diclofenac	15307-79-6	34~416	47~437	DMSO	200
13	Furosemide	54-31-9	31~225	-7~109	DMSO	200
14	Ketoprofen	22071-15-4	120~346	77~151	DMSO	200
15	Nalidixic acid	389-08-2	54~246	88~470	DMSO	200
16	Omeprazole	73590-58-6	-221~103	30~216	DMSO	200
17	Promethazine hydrochloride	58-33-3	20~168	-3~77	DMSO	200

4. 시험 방법

1) 96 웰 플레이트를 사용하여 아래의 그림 2와 같이 측정 대상 물질을 배치한다.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					Singlet oxygen							
B		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
C		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
D		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
E		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
F		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
G		B	P	N	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
H					Superoxide anion							

B: Blank

P: 양성대조물질(Quinine)

N: 음성대조물질(Sulisovenzone)

T1-T7: 시험물질 1 ~ 7

그림 2. 광반응 시험에서의 플레이트 배치도

2) DMSO를 용매로 하여 시험물질의 저장액을 조제한 경우에는 아래의 그림 3과 같은 시험 순서를 따른다.

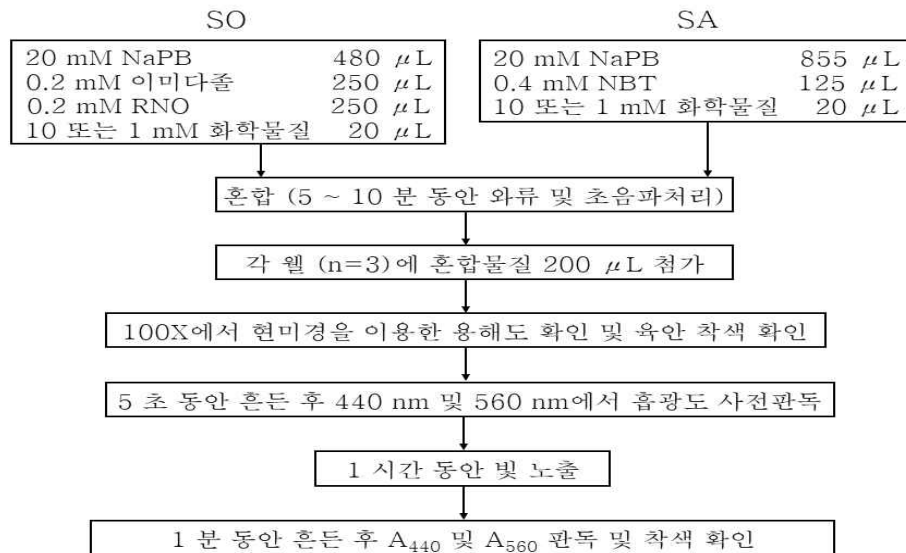


그림 3. 시험물질 저장액을 DMSO로 조제한 경우의 시험절차

3) 20 mM NaPB를 용매로 하여 시험물질의 저장액을 조제한 경우에는 아래의 그림 4와 같은 시험 순서를 따른다.

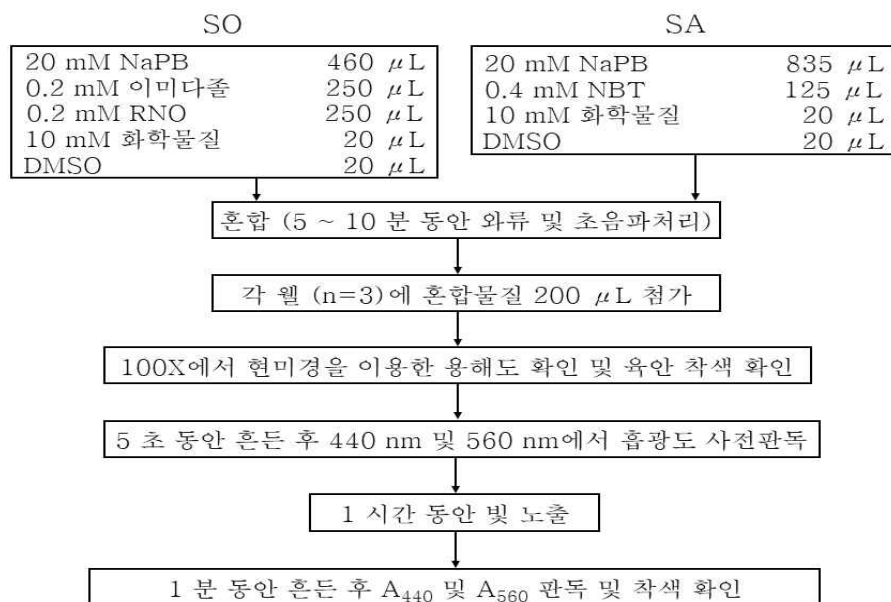


그림 4. 시험물질 저장액을 20 mM NaPB로 조제한 경우의 시험절차

5. 결과 분석

5.1. 측정값 계산

1) SO 값은 3 개 웰에 대해 측정하고 평균값과 표준편차로 나타낸다.

SO 값:

$$(\text{흡광도 감소 } A_{440}) \times 1000 = [A_{440}(-) - A_{440}(+) - (a-b)] \times 1000$$

$A_{440}(-)$: 440nm 광조사 이전 흡광도

$A_{440}(+)$: 440nm 광조사 이후 흡광도

a: 광조사 이전 용매대조군의 흡광도(평균)

b: 광조사 이후 용매대조군의 흡광도(평균)

2) SA 값은 3 개 웰에 대해 측정하고 평균값과 표준편차로 나타낸다.

SA 값:

$$(\text{증가된 흡광도 } A_{560}) \times 1000 = [A_{560}(+) - A_{560}(-) - (b-a)] \times 1000$$

$A_{560}(-)$: 560nm 광조사 이전 흡광도

$A_{560}(+)$: 560nm 광조사 이후 흡광도

a: 광조사 이전 용매대조군의 흡광도(평균)

b: 광조사 이후 용매대조군의 흡광도(평균)

5.2. 시험의 성립조건

1) 광조사 이전에 반응 혼합물질에서 시험물질의 침전이 발생하지 않아야 한다.

2) 광조사 이전 또는 이후에 반응 혼합물질에서 시험물질의 색 간섭이 나타나지 않아야 한다.

3) 온도 조절(20 ℃ ~ 29 ℃) 등의 기술적 문제가 없어야 한다.

4) A_{440} , A_{560} 의 원자료(Raw data) 범위가 0.02 ~ 1.5 사이여야 한다.

5) 양성 및 음성 대조물질의 측정값이 {(기존 평균값) ± (2 × 표준편차)} 범위의 값이어야 하며, 95 % 신뢰도를 만족하는 값에 해당하는 범위는 다음과 같다.

- 양성대조군(Quinine hydrochloride) 값 (200 μM에서의 3개 웰 평균)

: SO 측정값의 범위는 319 ~ 583이며, SA 측정값의 범위는 193 ~ 385이다.

- 음성대조군(Sulisobenzone) 값 (200 μM에서의 3개 웰 평균)

: SO 측정값의 범위는 -9 ~ 11이며, SA 측정값의 범위는 -20 ~ 2이다.

5.3. 판정 기준

각 시험물질의 결과 값은 다음의 표 2에 제시된 SO, SA 기준값에 따라 광반응성 (Photoreactive), 약한 광반응성(Weakly photoreactive), 비-광반응성 (Non-photoreactive), 판정할 수 없음(Inconclusive)으로 판정된다.

표 2. ROS 시험결과의 판정기준

판정	농도 (μ M)	SO (3개 웰 평균값)		SA (3개 웰 평균값)	
광반응성	200	25이상	그리고	70이상	
		25미만(그리고/또는 간섭)		70이상	
		25이상		70미만(그리고/또는 간섭)	
약한 광반응성	200	25미만		20이상 70미만	
광반응성	20	25이상		20이상	
광반응성 없음	200	25미만		20미만	
판정 불가	결과 값이 상기 어느 범주에도 속하지 않는 경우				

판정은 단회시험으로 하며 침전, 발색, 간섭 등이 나타날 경우 해당 시험물질은 이 시험법을 적용하기에 적절하지 않으며 따라서 시험결과는 판정불가로 한다.

Ⅲ. 시험결과 및 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야한다.

1. 시험물질

- 1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호 등과 같은 화학 물질 식별 정보
- 2) 물리적 성질 및 순도
- 3) 시험수행과 관련한 물리화학적 특징
- 4) 자외선/가시광선 흡광 스펙트럼
- 5) 화학적 안정성과 빛에 대한 안정성

2. 대조물질

- 1) 명칭, 제조사, 로트번호
- 2) 물리적 특성 및 순도
- 3) 보관 조건
- 4) 대조물질 용액 조제 방법
- 5) 최종 농도

3. 용매

- 1) 명칭, 제조사, 로트번호
- 2) 용매 선택의 근거
- 3) 용매에 대한 시험물질 용해도

4. 광조사 조건

- 1) 태양광 시뮬레이터의 종류와 제조사
- 2) 태양광 시뮬레이터 선택의 근거
- 3) 사용된 UVA 검출기
- 4) UVA 조사 강도(mW/cm^2)
- 5) UVA 조사량(J/cm^2)
- 6) 광조사 전후의 온도

5. ROS assay 실험 방법

6. 시험의 성립조건과 판정 기준

7. 결과

8. 토의

9. 결론

제70항 생체 외 눈 자극 및 손상시험(거대분자시험법)

I. 개요

1. 목적

본 시험은 각막 구조와 유사한 형태의 거대분자 기질을 사용하여 시험물질에 의해 거대분자 기질이 손상되어 발생하는 혼탁도를 측정함으로써 눈 자극 및 손상물질을 예측하는 데 그 목적이 있다.

2. 용어 정의

2.1. 눈 비자극성 물질

눈 자극 또는 눈 손상에 대한 분류 및 표시가 필요 없는 화학물질(No Category)로서 UN GHS 카테고리 1, 2, 2A 및 2B에 해당하지 않는 물질

2.2. Irritation Draize Equivalent (IDE) score

Ocular Irritation[®] 시험은 거대분자를 이용한 생체 외 눈 자극성/손상시험이며 이때 IDE score는 이 시험에서 보정 화학물질(Calibrators)로부터 얻은 표준 곡선과 비교하여 각 실험군의 흡광도를 상대적 숫자로 나타낸 값임

2.3. Maximal Qualified Score (MQS)

시험물질의 IDE score 중 가장 큰 값. 0부터 51까지의 범위를 나타내며 시험물질의 잠재적 눈 자극 여부를 예측하는 데 사용됨

II. 시험

1. 원리

이 시험법에서 사용되는 거대분자 기질은 단백질, 당단백질, 탄수화물, 지질, 저분자 물질 등으로 구성된 겔 매트릭스(Gel matrix)이며, 완충 용액으로 재수화(Rehydration) 될 경우 매우 규칙적이고 투명한 각막 구조와 유사한 형태가 된다. 한편, 각막 손상을 일으키는 시험물질은 콜라겐의 변성, 지질의 사포닌화, 단백질의

응집 및 침전, 지질의 용해 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 이 시험법의 결과는 시험물질을 거대분자에 노출시킨 후 거대분자 기질이 손상될 경우 발생하는 혼탁도를 405 nm에서 분광계로 측정함으로써 눈 자극 및 손상을 예측하는 데 사용된다.

2. 고려사항

이 시험법은 고체나 액체 모두 적용 가능하며, 시험물질을 10 % 용액/분산액으로 조제하였을 때 그 pH가 4이상 9이하인 경우에 적용한다. 액체 시험물질은 점성의 유무와 관계없이, 그리고 고체 시험물질은 계면활성만 나타내지 않는다면 물에 대한 용해성에 관계없이 이 시험법을 적용할 수 있다. 기체와 에어로졸은 시험법을 적용할 수 없다. 눈자극성 화학물질로서 UN GHS Category 2 (2A, 2B)물질을 판정하고자 하는 경우에는 이 시험법을 사용하는 것은 적절하지 않다.

3. 시험의 준비

3.1. 시험물질의 특성 확인

시험물질 10 % 수용액의 pH가 시험 적용 범위 안에 존재하는지 확인한다. 또한, 시험물질의 계면활성 여부가 확인되지 않은 경우, 거품생성시험(Foam test)을 수행하여 계면활성 여부를 확인한다. 거품생성시험은 시험물질 용액(10 %)을 10 초간 격렬히 흔든 후 거품 층의 생성비율과 지속성을 관찰하여 평가한다.

3.2. 거대분자 겔 매트릭스

Ocular Irritation[®] 시험 kit에 포함된 시약 파우더를 수화 용액에 녹여서 거대분자 기질을 만든 후 여과한다. 온도는 20 °C ~ 25 °C 이어야 하며, pH는 7.9 ~ 8.2 범위 내에 속해야 한다. 시약 용액은 pH를 낮추고 규칙적인 구조의 거대분자 기질을 형성하기 위해 활성화 완충용액을 이용해 활성화되어야 한다. 활성화 이후의 pH는 20 °C ~ 25 °C 에서 6.4 ~ 6.7 범위 내에 들어가야 한다. 활성화된 단백질 기질 시약 용액을 24 웰 플레이트에 나누어 옮긴다.

3.3. 숙련도 시험

이 시험을 일상적으로 수행하여 시험결과를 얻기 위해서는 우선 이 시험에 대한 실험실의 숙련도가 입증되어야 한다. 표 1에 나열된 12 개의 숙련도 시험물질을 실험한 후 표에 제시된 분류기준과 일치하는지 확인한다.

표 1. 숙련도물질 및 분류기준

화학물질명	CAS 번호	생체 내 UN GHS	물리적 상태	pH	MQS 범위/n=runs/ 평균(표준편차)	분류기준
2-methylresorcinol	608-25-3	Cat. 1	고체	5.8	>51/n=9/n.a(n.a)	Cat. 1
4-tert-butylcatechol	98-29-3	Cat. 1	고체	5.5	>51/n=9/n.a(n.a)	Cat. 1
Benzalkonium chloride (5 %)	63449-41-2	Cat. 1	액체	6.5	49.5/n=1/n.a(n.a)	Cat. 1
Promethazine hydrochloride	58-33-3	Cat. 1	고체	4.5	>51/n=9/n.a(n.a)	Cat. 1
Ammonium nitrate	6484-52-2	Cat. 2A	고체	4.8	14.1~27.3/n=12/20.2(3.0)	No prediction can be made
Cetyl pyridinium bromide (1 %)	140-72-7	Cat. 2A	액체	4.7	15/n=1/n.a(n.a)	No prediction can be made
Methyl acetate	79-20-9	Cat. 2A	액체	6.8	15.0~21.1/n=12/18.6(1.5)	No prediction can be made
Sodium benzoate	532-32-1	Cat. 2A	고체	8.2	7.4~20/n=9/15.4(2.5)	No prediction can be made
1,5-dibromopentane	111-24-0	No Cat.	액체	5.7	6.7~10.3/n=9/8.6(1.0)	No Cat.
Cetyl pyridinium bromide (0.1 %)	140-72-7	No Cat.	액체	7.1	4~12.5/n=10/6.8(1.5)	No Cat.
Myristyl myristate	3234-85-3	No Cat.	고체	6.3	2.7~6.5/n=9/4.6(1.3)	No Cat.
Potassium tetrafluoroborate	14075-53-7	No Cat.	고체	4.5	6.8~19.2/n=11/9.9(2.1)	No Cat.

4. 시험 방법

이 시험법의 시험 방법은 Ocular Irritection® 시험 kit의 프로토콜에 기반을 두고 있으며 Ocular Irritection® 시험 kit는 이 시험법에서 적용하는 유일한 거대분자 기질 시험법이다.

4.1. 시험물질 및 대조물질의 적용

1) 거대분자 기질에 시험물질을 적용하는 것은 시험물질의 물리화학적 성질에 따라 각각 다르며 적용방법은 그림 1에 잘 나타나 있다.

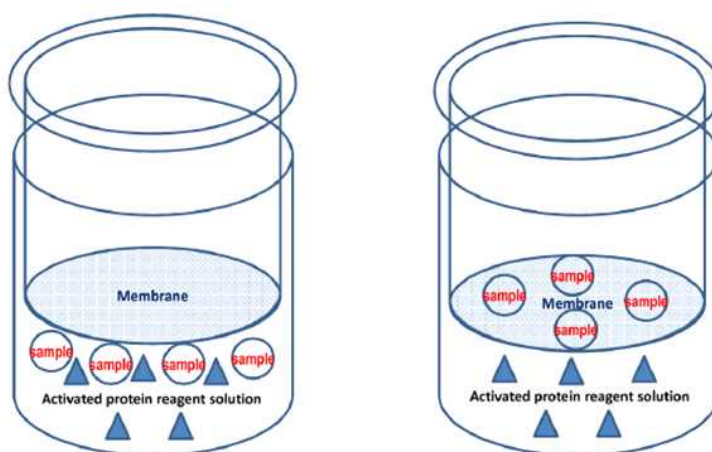
① 비-계면활성 시험물질의 경우 아래 용량을 기질 시약위에 설치된 멤브레인 디스크 위에 적용시킨다.

액체시험물질 : 25 μ L, 50 μ L, 75 μ L, 100 μ L, 125 μ L

고체시험물질 : 25 mg, 50 mg, 75 mg, 100 mg, 125 mg

② 계면활성 시험물질의 경우 증류수를 이용하여 먼저 5 % 용액으로 조제한 후 이를 희석하여 0.3125 %, 0.625 %, 1.25 %, 2.5 %, 5 % 농도로 만든 용액을 125 μ L 씩 거대분자 기질 용액에 직접 적용하고 멤브레인 디스크로 덮는다.

③ 밀랍 고체(Waxy solid) 시험물질의 경우 희석하지 않은 상태로 거대분자 기질 용액에 직접 적용하고 멤브레인 디스크로 덮는다.



계면활성 및 비-계면활성 밀랍 고체의 경우 밀랍 고체 제외 비-계면활성의 경우

그림 1. 시험물질 적용방법

2) 시험물질 적용 시간 및 관찰

거대분자 기질을 25 °C ± 1 °C로 유지되는 항온배양기 안에서 24 시간 ± 0.5 시간 동안 시험물질 및 대조물질에 노출시킨다. 비-계면활성 시험물질이 적용된 멤브레인 디스크가 손상되지 않았는지 확인한다. 웰 안의 기질 부피가 감소하였다면 시험물질의 흡습성이 원인일 수 있으므로, 이 현상이 반복될 경우 해당 시험물질은 시험하지 않는다.

3) 대조물질의 적용

이 시험법의 Ocular Irritation[®] 시험 kit는 4 가지의 보정 화학물질(Calibrating chemicals)과 2 가지의 품질확인용(QC, Quality Control) 대조물질을 제공한다. 보정 화학물질은 UN GHS No Category에서 Category 1까지의 범위에 해당하는 물질들을 포함하며, IDE score 결정을 위한 표준 곡선을 설정하는 데에 사용된다. 2 가지 품질확인용 대조물질은 잠재적 눈 자극성과 연관된 IDE 범위를 가지며, 그 값은 각각 시험 결과에 따른 분류기준 예측 값의 cut-off 값 근처에 해당한다.

4.2. IDE 및 MQS score 측정

항온 배양이 끝난 후 시험물질 및 대조물질이 처리된 샘플을 96 웰 플레이트로 옮기고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 측정된 흡광도 값을 바탕으로 그림 2에 설명된 식에 의해 소프트웨어를 사용하여 IDE score를 계산한다. MQS는 얻어진 IDE score 중 가장 큰 값으로 한다.

방정식 1 : $OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 순 $OD_X < OD_{cal\ 1}$ 인 경우,
 $IDE = (OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 순 } OD_X / OD_{cal\ 1}) \times 12.5$

방정식 2: $OD_{cal\ 1} < OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 순 $OD_X < OD_{cal\ 2}$ 인 경우,
 $IDE = [(OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 순 } OD_X - OD_{cal\ 1}) / (OD_{cal\ 2} - OD_{cal\ 1})] \times 17.5 + 12.5$

방정식 3: $OD_{cal\ 2} < OD_{QC\ 1, 2}$ 또는 순 $OD_X < OD_{cal\ 3}$ 인 경우,
 $IDE = [(OD_{QC\ 1, 2} \text{ 또는 순 } OD_X - OD_{cal\ 2}) / (OD_{cal\ 3} - OD_{cal\ 2})] \times 21.0 + 30$

시험물질 순 $OD_X > OD_{cal\ 3}$ 인 경우 더 큰 교정 값(Calibrator value)이 없기 때문에 선형 외삽법으로 IDE score를 계산할 수 없다.

시험물질에 대한 순 $OD_X =$ 시약 $OD_X -$ blanking 완충액 OD_X , 시험물질로부터의 잠재적인 배경 판독을 설명

x: 시험물질의 용량 또는 농도. 시약 OD는 시약 용액을 포함하는 웰에서의 시험물질 판독 값을 나타냄. Blank OD는 blanking 완충액 안에 시험물질을 포함하는 웰에서의 판독 값을 나타냄. $OD_{QC\ 1, 2}$ 및 $OD_{cal\ 0, 1, 2, 3}$ 은 시약 용액을 포함하는 웰에서 교정(Cal) 및 품질관리(QC) 화학물질에 대한 OD 판독 값을 나타낸다. 이러한 대조물질은 405 nm에서 배경 판독 값에 기여하지 않는 것으로 알려져 있다.

5. 결과 분석

5.1. 시험의 성립조건

1) 시험결과가 아래 2 가지 범주 중에서 1 가지 이상을 만족하여야 한다.

(표 2 참고)

- ① 4 종 보정 화학물질과 1 종 이상의 QC 대조물질로부터 얻어진 값이 모두 허용 범위 내에 존재할 때
- ② 3 가지 보정 화학물질과 2 가지 QC 대조물질로부터 얻어진 값이 모두 허용 범위 내에 존재할 때

표 2. Ocular Irritection[®] 시험에서 보정 화학물질과 QC 대조물질에 대한 시험의 성립기준

OD ₄₀₅ 허용 범위	
보정 화학물질 0	0.062 ~ 0.262
보정 화학물질 1	0.089 ~ 0.315
보정 화학물질 2	0.351 ~ 0.945
보정 화학물질 3	1.277 ~ 2.127
IDE 허용 범위	
QC 1	7.2 ~ 20.8
QC 2	23.6 ~ 35.6

2) 소프트웨어를 사용하여 다음의 추가적인 검증을 수행함으로써 시험의 성립 기준을 만족하는 조건에서 MQS 값을 도출하여야 한다.

- ① 시험물질의 순(Net) 흡광도 값은 -0.015 보다 커야한다.
- ② 순 흡광도 값이 OD_{Cal 2} 보다 낮게 나오면 추가적인 확인을 통해 거대분자 기질이 적절히 반응하고 있는지 검증한다.
- ③ 시험물질의 어느 농도군 에서든지 Blank 흡광도가 1.2보다 크면 시험물질의 간섭을 의미한다. 재확인하여 같은 결과가 나오면 시험에서 배제한다.
- ④ 만약 용량 의존성 반응이 불규칙한 패턴으로 관찰된다면 해당 IDE 값들을 배제한다.

5.2. 결과 해석 및 판정기준

각 시험물질의 흡광도 값으로부터 얻어진 IDE score의 가장 큰 값으로 MQS 값이 정해지면, 다음의 표 3에 제시된 예측 모델에 따라 해당 시험물질의 잠재적인 눈 독성을 판정한다.

표 3. MQS에 따른 UN GHS 카테고리의 분류 및 판정기준

Maximal Qualified Score (MQS)	UN GHS 카테고리 분류 및 판정 기준
0 ~ 12.5	비자극성 물질 (눈 자극성 분류가 필요하지 않은 물질) (No category)
> 12.5 ~ 30.0	판정 보류 (본 시험만으로는 눈자극성을 분류할 수 없어 추가적인 시험이 필요한 물질) (No prediction can be made)
> 30.0	Category 1

Ⅲ. 시험결과 및 보고

시험 보고서에는 다음 정보가 포함되어야한다.

1. 시험물질 및 대조물질

- 1) IUPAC 또는 CAS 명, CAS 번호, SMILES, InChI 코드, 구조식 등과 같은 화학 물질 식별 정보
- 2) 순도 및 물질 구성
- 3) 다조성물질 또는 UVCBs(Unknown or Variable composition, Complex reaction products or Biological materials)인 경우, 화학물질 식별 정보, 순도, 물리화학적 특성
- 4) 물리적 성상, 휘발성, pH, 안정성, 수용성, 색깔, 광학 밀도, 흡광 특성
- 5) 10 % 시험물질용액의 pH
- 6) 거품생성시험 결과
- 7) 전처리 내용

8) 저장 조건

9) 용매 종류

2. 제조사 및 시험기관 정보

1) 주소, 회사명, 시험책임자 이름

3. 시험 조건

1) 시험 시스템의 정의

2) 숙련도 시험 방법

4. 시험 방법

1) 사용 농도 개수

2) 사용된 용매 특성

3) 시험 농도 및 적용(노출) 시간

4) 변경된 시험 방법 설명

5. 결과

1) 보정물질과 품질관리 물질에 대한 OD₄₀₅ 값

2) 시험물질 각 농도에 대한 OD₄₀₅ 값과 IDE score

3) 시험의 성립조건에 대한 판정 결과

4) 재시험 결과

5) 시험 종료시에 관찰된 모든 효과들에 대한 설명

6) MQS 값 및 UN GHS 카테고리 판정결과

6. 토의

7. 결론