한국환경보건학회지, 제38권 제6호(2012)
J Environ Health Sci, 2012: 38(6): 561-567
http://dx.doi.org/10.5668/JEHS.2012.38.6.561
[원 저]

온라인 고체상추출과 LC-MS/MS 기술을 이용한 소변 중 파라벤류 분석

김정환 · 고영림*† · 김판기** · 정지연** · 이은희*** · 이승열**** · 남혜선**** · 이규식****
을지대학교 식품산업외식학과, *을지대학교 보건환경안전학과, **용인대학교 산업환경보건학과,
***극동대학교 보건과학대학원, ****식품의약품안전평가원 위해영향연구팀

Determination of 4 Parabens in Human Urine by Online SPE and LC-MS/MS Techniques

Jung Hoan Kim, Young Lim Kho*†, Pan Gyi Kim, Jee Yeon Jeong**, Eun Hee Lee***, Seung-Youl Lee****, Hye-Seon Nam****, and Gyu-Seek Rhee****

Department of Food Technology & Service, Eulji University, Sungnam, Korea
**Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Sungnam, Korea*
***Department of Occupational & Environmental Health, Yongin University, Yongin, Korea*
****Graduate School of Health Science, Far East University, Gamgok, Korea*
*****Health Effect Analysis Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Korea*

ABSTRACT

Objectives: Parabens are widely used as antimicrobial agents in pharmaceuticals and cosmetics as well as by the food industry. Parabens have been reported to show weak estrogenic activity and be related to health effects such as allergic reactions and skin and breast cancer. We evaluated an online solid phase extraction (SPE) method coupled with LC-MS/MS technique using free and conjugated parent parabens in human urine for assessing human exposure to parabens.

Methods: We employed LC/MS/MS through online solid phase extraction and column-switching techniques and analyzed free and conjugated parabens as biomarkers of human exposure. Four major parabens, methyl-paraben (MP), ethyl-paraben (EP), propyl-paraben (PP) and butyl-paraben (BP), were analyzed. Method validation was performed by sensitivity, accuracy, precision and comparison of the results of online SPE with offline SPE.

Results: The limits of detection (LOD) were in the range of 0.2-2 ng/mL, and actual limits of quantification (LOQ) were in the range of 0.7-6 ng/mL urine, depending upon the compound. Accuracy was in the range of 98.3-106.4%, and precision was in the range of 1.3-8.7% (CV) depending upon the compound. We found a good correlation between the results of analysis by online SPE method and that by off-line SPE method.

Conclusions: The online SPE method showed proper LOD and validated accuracy, precision and good correlation with the offline method for analyzing parabens in urine.

Keywords: parabens, online-SPE, LC-MS/MS, biomonitoring, urine

†**Corresponding author:** Department of Health, Environment & Safety, Eulji University, Sungnam 461-713, Korea, Tel: +82-31-740-7142, Fax: +82-31-740-7327, E-mail: ylkho@eulji.ac.kr
Received: 13 November 2012, Revised: 16 November 2012, Accepted: 27 November 2012

I. 서 론

파라벤 (paraben)은 메틸파라벤(methylparaben, MP), 에틸파라벤(ethylparaben, EP), n-프로필파라벤(n-propylparaben, PP), n-부틸파라벤(n-butylparaben, BP) 등의 형태로 화장품, 식품, 의약품 및 위생용품에 보존료로 사용되고 있다. 따라서 현대인들은 일상생활 속에서 항상 파라벤류에 노출되어 있다.

사람들은 파라벤류를 함유하는 제품을 만지거나, 삼키거나 섭취함으로써 노출되는데, 파라벤류의 체내축적 정도에 관한 연구에 따르면, 유방 종양 조직에서 20.6±4.2 ng/g의 파라벤류가 검출되었으며, MP의 농도가 12.8±2.2 ng/g으로 가장 높게 나타났다.[1] 미국 2005-2006 NHANES 조사에서 6세 이상 2,548명의 소변에서 파라벤류를 측정한 결과, MP와 PP가 조사대상 인구 대부분의 소변에서 검출되었으며, 이는 파라벤류가 모든 사람들에게 널리 노출되고 있음을 의미한다[2]. 한 연구에서는 4개의 모유 시료를 분석하여 모든 시료에서 측정 가능한 MP가 존재함(0.5~3 ng/ml)을 보고하였다.[3]

화장품이나 의약품에 첨가된 파라벤류는 피부를 통하여 흡수되며, 제시된 허용 한도 내에서 사용하더라도 민감한 사람의 경우 접촉피부염 등 문제를 일으킬 수 있다. 화장품 사용과 관련한 접촉피부염의 원인 물질로 향료와 방부제가 주요한 원인 물질이라는 보고가 있다.[4] 정 등(2010)[5]은 화장품에 의한 접촉피부염이 의심되는 국내 환자들에서 방부제 성분들에 대한 첩포 반응 양성률을 시험한 결과, 파라벤류의 경우 시험자의 4.5%에서 양성률을 보였다. 파라벤은 식품공전에 파라옥시안식향산 (p-hydroxybenzoate) 으로 등록이 되어 있으며, 파라옥시안식향산메틸과 파라옥시안식향산에틸로서 잼, 간장, 소스 등의 식품에 사용할 수 있다.[6] 의약품의 경우는 파라옥시벤조산메틸(MP), 파라옥시벤조산메틸나트륨, 파라옥시벤조산부틸(BP), 파라옥시벤조산에틸(EP), 파라옥시벤조산프로필(PP) 및 파라옥시벤조산프로필나트륨이 방부제, 보존제로서의 사용이 허가되어 있다.[7]

파라벤류의 내분비독성 및 생식독성 등, 생태계는 물론 인체에서도 위해성이 확인됨에 따라 파라벤류의 사용이 일부 제한되고 있다.[8] Lee와 Lee (2009)에 따르면 암컷 흰쥐에서 사춘기 개시 전 특정시기에 MP의 투여가 생식계를 활성시키고 그 결과 사춘기 개시를 앞당길 수 있음을 확인하였다.[9] Oishi(2002)[10]는 실험동물을 이용한 연구에서 BP이 일본의 일일허용섭취량(ADI) 이하의 농도에서도 남성의 생식기관에 악영향을 나타낼 수 있음을 보고하였다.

그러나 파라벤류가 가지고 있는 다양한 인체 영향에도 불구하고 이에 대한 규제는 미흡한 실정이다. 더욱이, 파라벤류에 대한 관리대책이 필요함에도 불구하고, 워낙 다양하고 광범위한 용도로 인하여 인체노출평가가 수행되기 어렵기 때문에, 정확한 노출차단을 통한 관리대책을 수립하기 어려운 상황이다. 따라서, 파라벤류 노출량을 추정할 수 있는 생체지표를 선정하고, 정확하게 측정하는 방법이 개발되어야 한다.

이에 본 연구는 화장품, 식품, 의약품의 보존제로 사용하고 있는 파라벤류의 신속한 인체노출평가를 위하여 소변시료를 온라인 고체상추출에 의해 전처리하여 LC-MS/MS 시스템에서 분석하는 기법의 정확도를 검증하기 위한 목적으로 수행되었다. 이를 통해 이 기법이 소변 시료 중 파라벤류 모니터링을 위해 적용될 수 있는지 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 분석대상 물질 및 재료

소변 중 파라벤류 측정을 위한 온라인 고체상추출 및 LC-MS/MS 방법은 Ye 등[11]이 개발한 방법을 일부 변경하여 사용하였다.

연구 대상 물질은 MP, EP, PP, BP 등 4종의 파라벤이었다. 각각의 표준물질은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 수소 대신 중수소(^{2}H)로 치환된 내부표준물질(internal standard, IS)인 MP-d_4, EP-d_4, PP-d_4, BP-d_4를 CDN ISOTOPE 사에서 구입하여 이용하였다. 분석대상물질 4종의 분자구조는 Fig. 1과 같다. 고체상추출 및 HPLC 분석을 위해 이용된 증류수와 용매는 모두 Burdick & Jackson(Morristown, NJ, USA) 사에서 구입하였으며, 완충용액 제조를 위해 포름산암모늄(ammonium formate), 아세트산암모늄(ammonium acetate) 및 포름산(formic acid)을 Fluka(Buchs, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

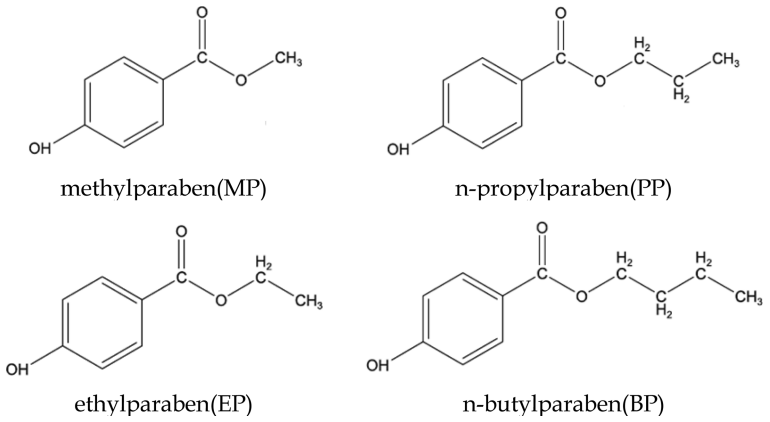

Fig. 1. Chemical structures of four parabens under study.

2. 소변시료의 전처리

본 연구에 이용된 소변 시료는 2010년 3-18세 사이의 어린이 및 청소년들로부터 식품의약품안전청에서 수집한 일시뇨(spot urine)이며, 분석방법 개발을 위해 10%(n=104)를 임의추출하여 사용하였다. 소변 시료는 전처리가 진행되기 전까지 냉동보관하였다. 소변에 포함된 파라벤류는 대부분 글루쿠론산(glucuronide) 및 황산(sulfate)과 결합하고 있으므로 이 결합을 끊어주기 위하여 효소(β-glucuronidase/sulfatase)를 이용한 가수분해반응을 진행하였다. 소변 100 μl를 1.5 ml 원심분리관에 넣고 효소반응을 위해 0.1M 아세트산 830 μl와 효소 10 μl 및 내부표준물질(IS) 혼합액(200 ng/ml) 10 μl를 넣고 잘 혼합한 후 4시간동안 37°C로 맞춰진 배양기에서 반응시킨 후 HPLC 시스템에 주입하였다. 온라인 전처리를 이용한 시료준비과정은 그림 2와 같다.

온라인 고체상추출법의 유효성을 확인하기 위하여 오프라인 고체상추출법을 동시에 진행하였다. 오프라인 고체상추출법의 경우 시료의 사용량을 1 ml로 하였으며, 효소에 의한 가수분해가 완료된 시료는 세척과 농축을 위해 Sep-pak C_{18} 카트리지(1 cc/100 mg, waters)를 이용한 고체상추출(solid phase extraction)을 실시하였다. 우선, 2 ml 메탄올과 2 ml 초순수로 카트리지를 활성화하고, 2 ml 초순수와 2 ml 30% 메탄올로 세척한 후 1 ml 메탄올로 용출시켰다. 각 시료간의 분석오차를 줄이기 위하여 동시에 24 포트(port)의 SPE를 동시에 진행할 수 있는 매니폴더(Supelco, St. Louis, MO, USA)를 이용하였다. 고체상추출에서 용출된 시료를 2 ml 바이알(vial)에 넣고 LC-MS/MS 시스템에서 정량분석하였다.

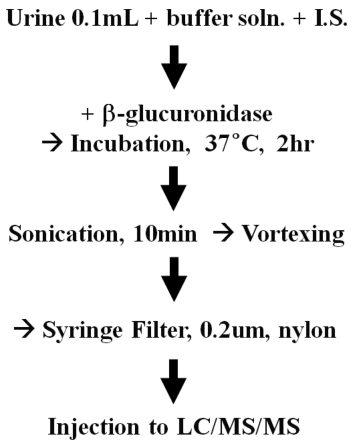

Fig. 2. Sample preparation procedure for online solid phase extraction.

검량선 작성을 위하여 인공 소변에 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 250, 500 ng/ml 농도가 되도록 표준물질을 첨가하여 표준용액을 제조하고 시료를 처리하는 방법과 같은 시료준비과정을 거친 후 LC-MS/MS 시스템에서 분석하였다.

3. LC-MS/MS 분석

소변 중 파라벤류 분석에 이용된 액체크로마토그래피 시스템은 온라인 고체상추출을 위하여 자동시료주입기(autosampler), 복식 펌프(dual pump), 컬럼오븐, 기포제거장치(vacuum degaser), 밸브(switching valve)가 포함된 Nanopace II(Shiseido, Tokyo, Japan)

Table 1. HPLC condition for on-line SPE method

Parameter	Condition
Column	On-line HLB(Waters) Synergi 4U Fusion-RP
Mobile phase	A : 0.1% acetic acid in water B : 0.1% acetic acid in acetonitrile
Gradient (400 μl/min)	Time(min) 0 10 13 16 16.1 20 B % 30 55 90 90 30 30
Switching valve	Time(min) 0 3 20 Position A B A

를 사용하였으며, 오프라인 고체상추출에는 Agilent 1100 시리즈(Berkshire, UK)를 이용하였다.

효소반응을 통해 가수분해된 시료 50 μl를 온라인 고체상추출을 위한 HPLC 시스템에 주입하였으며, 오프라인 고체상추출 과정으로 전처리된 용액은 10 μl를 주입하였다. 시료의 분리는 Synergi 4U Fusion-RP(80A, 2.0×75 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA) 컬럼을 이용하였으며, 경사용매법(gradient mode)을 이용하여 분석하였다. 분리를 위한 이동상은 0.1% 아세트산이 포함된 증류수(A)와 0.1% 아세트산이 포함된 아세토니트릴(B)이었다. 유량은 400 μl이었으며, 용매는 초기 조건 30% B에서 10분 만에 55% B로 직선상 증가시켰으며 다시 3분 만에 90% B로 증가시킨 후 3분 동안 유지하다가 초기 조건으로 되돌아오도록 하였다(Table 1).

분석대상물질의 검출을 위해 API 4000(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 고분해능 사중극자 질량분석기(triple quadrupole mass spectrometer)가 이용되었다. 파라벤류 분석은 ESI(electron spray ionization) 음이온 방식(negative mode)에서 이루어졌으며 하바드(Harvard) 펌프를 이용한 유량 10 μl/min로 주입(infusion) 하는 방식에 의한 정량적 최적화(quantitative optimization)를 통해 정량분석을 위한 질량분석기(mass spectrometer) 조건을 확립하였다. 분석은 MRM(multiple reaction mode) 방식에서 진행되었으며, 확립된 질량분석 조건은 다음 Table 2와 같다.

질량분석기의 파라미터(parameter)는 분석의 감도를 최상으로 유지하기 위하여 커튼가스(curtain gas) 25 Mpsi, GS1 40 Mpsi, GS2 60 Mpsi, 검출기 온도 400°C를 이용하였으며 모든 분석대상물질의 EP(entrance potential)는 −10.0 V로 유지하였다. 이온소스(Ion souce)는 ESI 음이온(negative) 방식을 이용하였으며 이온소스 에너지는 −4500 V를 유지하였다. 이온소스의 충돌 에너지(collision energy)를 표현하는 CAD(collisionally activated dissociation)는 6 eV로 고정하였다.

Table 2. Operational parameters for mass spectrometer

Compound	Q1	Q3	DP	CE	CXP
Methylparaben	151	92	-55	-28	-5
Methylparaben-d_4	155	96	-55	-28	-5
Ethylparaben	165	92	-60	-32	-15
Ethylparaben-d_4	169	96	-55	-34	-7
n-Propylparaben	179	92	-65	-30	-5
n-Propylparaben-d_4	183	96	-60	-32	-7
n-Butylparaben	193	92	-70	-35	-14
n-Butylparaben-d_4	197	96	-70	-38	-7

- DP : Declustering Potential, V
- CE : Collision Energy, V
- CXP : Collision Cell Exit Potential, V
- Q1 : Precursor ion mass, m/z
- Q3 : Daughter ion mass, m/z.

4. 분석방법의 타당성 평가

소변 중 파라벤류를 온라인 고체상추출을 이용하여 분석하기 위한 본 연구에서 검출한계의 결정은 미국 식품의약품안전청(FDA)이 정의한 분석절차의 검증에서 규정하고 있는 개념을 사용하였으며, 그 구하는 방법은 다음 식과 같다.[12)]

검출한계 = 3.3 × SE/S

SE : 공시료를 포함한 가능한 낮은 농도들로 작성한 검량선 회기직선의 y 절편 표준편차

S : 회귀직선의 기울기

소변시료의 매트릭스 효과를 반영하기 위하여 분석대상 물질은 존재하지 않고 이온성분들이 포함된 인공 소변을 조제하여 검량선 작성 및 정확도 및 정밀도 측정에 활용하였다. 인공 소변에 일정량의 표준물질을 첨가한 후 시료를 분석한 방법과 같은 방법으로 전처리와 분석을 수행하고 정확도(accuracy)와 정밀도(precision)를 평가하였다. 정확도는 [검출량/첨가량]×100으로 계산하는 회수율(recovery, %)로 평가하였으며, 정밀도는 7회 반복 분석에서의 변이계수(CV)로 평가하였다.

온라인 SPE 방법의 적절성 및 활용가능성을 평가

Table 3. Comparison of the LOD/LOQ between on-line and off-line method

Compounds	Methylparaben (ng/mL)		Ethylparaben (ng/mL)		n-Propylparaben (ng/mL)		n-Butylparaben (ng/mL)	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
On-line	0.7	2.1	0.2	0.7	0.3	0.9	0.5	1.6
Off-line	0.6	2.0	0.2	0.6	0.2	0.7	0.1	0.3

Table 4. Accuracy and precision for analysis of urinary parabens

Compounds	Accuracy(%, n=7)				Precision(%, n=7)			
	LOQ (1 ng/ml)	Low (10 ng/ml)	Medium (100 ng/ml)	High (250 ng/ml)	LOQ (1 ng/ml)	Low (10 ng/ml)	Medium (100 ng/ml)	High (250 ng/ml)
Methylparaben	103.1	105.5	102.7	98.3	5.7	3.1	4.2	4.4
Ethylparaben	101.8	103.5	105.1	100.2	8.7	2.6	1.3	1.6
n-Propylparaben	106.4	102.1	103.6	99.0	8.6	4.3	2.7	1.4
n-Butylparaben	103.4	99.6	107.3	99.9	4.0	1.4	2.7	2.8

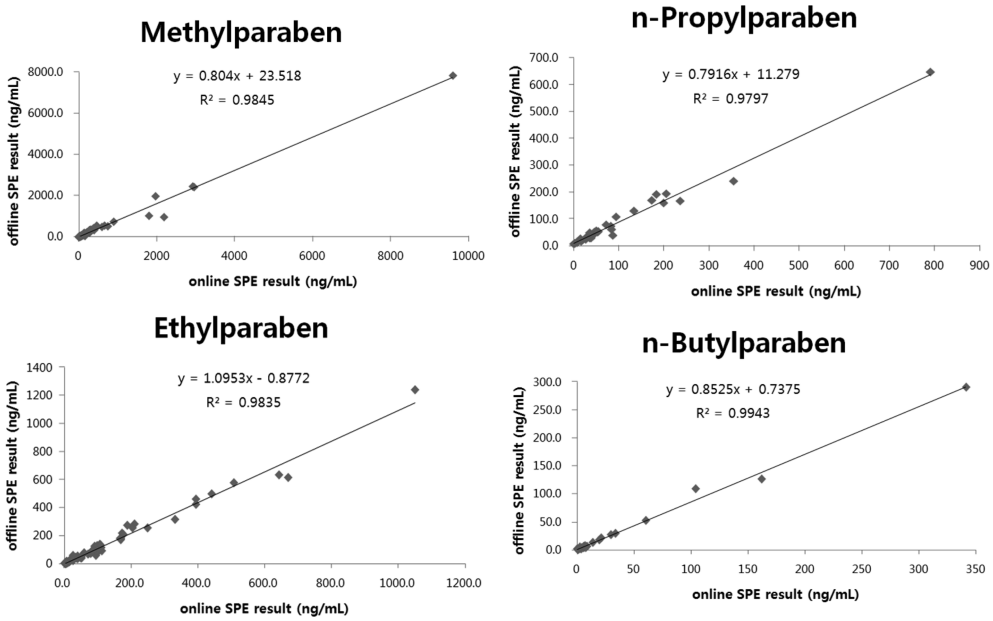

Fig. 3. Correlation between the results of on-line SPE and off-line SPE(n=104).

하기 위하여 2012년 식약청에서 확립된 오프라인 SPE를 활용한 분석방법에 의한 분석과 실제 소변시료 분석 결과의 상관성을 비교하였다.

III. 결 과

1. 소변 중 파라벤류 분석법 검증

소변시료의 매트릭스 효과를 반영하기 위하여 분석대상 물질은 존재하지 않고 이온성분들이 포함된 인공 소변을 조제하여 검량선 작성 및 정확도 및 정밀도 측정에 활용하였다. 온라인 고체상추출을 이용한 분석법의 직선성(linearity)은 검량범위인 0.1~500 ng/ml 구간에서 4종의 파라벤 모두 $r^2 > 0.99$로 정량분석에 충분한 값[13]을 나타내었다.

FDA 방식으로 계산한 검출한계(LOD)의 경우 Table 3과 같이 0.1~0.6 ng/ml로 나타났다. 오프라인 고체상추출을 이용한 분석에서와 유사한 민감도(sensitivity)를 보였으며, Casas 등[14]이 소변 중 파라벤류를 측

Table 5. Determination methods and levels of parabens in human urine

Reference	Country	n	Method	Median concentration(ng/ml)			
				MP	EP	PP	BP
Ye et al. 2006[11]	USA	22	Off-line SPE	41.4	2.5	10.2	<LOD
Casas et al. 2011[14]	Spain	30	Off-line SPE	150.0	8.1	21.5	1.2
Shirai et al. 2012[17]	Japan	111	Off-line SPE	75.8	7.5	20.2	0.6
This study	Korea	104	On-line SPE	81.2	28.9	4.5	<LOD

정하기 위해 제시한 검출한계 범위인 0.2 ~ 1.0 ng/ml 보다 우수하였다.

인공 소변에 정량한계 농도(1 ng/ml) 및 저, 중, 고 농도(10, 100, 250 ng/ml)가 되도록 표준물질 혼합액을 첨가하여 분석한 정확도 검증 결과 4종의 파라벤 모두 98.3~107.3으로 안정적인 값을 보였다. 그리고 반복실험에 대한 일정성을 표현하는 정밀도의 경우 변이계수(CV) 값이 정량한계 농도 이외의 경우에는 모두 5% 미만으로 나타났다(Table 4).

각 분석대상물질별 온라인과 오프라인 SPE를 통한 분석법에 의한 분석결과를 비교하면 Fig. 3과 같이 나타난다.

온라인 SPE에 의한 분석방법과 오프라인 SPE를 활용한 분석방법에 의한 소변 시료 측정 결과 값의 상관성은 통계적으로 유의한 수준($p<0.001$)으로 나타났으며, 상관계수(r) 값도 4종의 파라벤 모두에서 0.98 이상으로 높은 값을 보여주었다.

IV. 고 찰

본 결과는 온라인 SPE 방법이 기존 오프라인 SPE 방법의 훌륭한 대안이 될 수 있음을 의미한다. 특히, 대단위의 인체시료를 대상으로 한 노출평가를 진행하기 위해서는 분석에 소요되는 장비, 인력에 대한 비용이 고려되어야 하며 이러한 시료처리능력 및 경제적 고려에서 볼 때 온라인 SPE 방법은 좋은 선택이 될 것이다. 전처리에 사용되는 인력이나 재료비는 오프라인 SPE 방법에 비해 절반 이하로 줄어들 수 있을 것이다.

파라벤의 경우 체내에 축적되지 않는다고 알려져 있으며, 소변은 파라벤류의 노출량을 추정하기 위한 좋은 생체시료이다.[15] 소변으로 배출되는 파라벤류의 대부분은 황산(sulfate)이나 글루쿠론산(glucuronide) 등과 결합되어 배출된다. 소변 중으로 배출되는 결합하지 않은(free) 파라벤류와 결합된(conjugated) 파라벤류의 비율을 측정한 결과 결합된 파라벤류가 95% 이상인 것으로 보고된다.[16] 따라서, 소변 중 파라벤류 측정을 위한 시료준비 과정에 효소를 이용하여 가수분해하는 과정은 필수적일 것으로 판단된다.

소변 중 파라벤류 분석을 위한 전처리 방법과 농도를 비교하여 Table 5에 제시하였다. 현재까지는 많은 연구자들이 오프라인 SPE 방법을 이용하여 분석하고 있었으며, 모두 LC-MS/MS 시스템을 활용하였다. 파라벤류의 다른 연구에서의 소변 중 농도와 비교하면, 본 연구 결과에서는 MP 농도는 유사한 수준을 나타내고 있지만, PP와 BP의 농도는 낮은 편이며, EP의 농도는 높은 편이었다. 이는 생활습관 및 식습관이 전혀 다르기 때문일 것으로 보인다.

본 연구에서 활용한 104개의 어린이 소변시료 분석 결과 분석대상 물질의 검출비율은 MP 98.1%, EP 95.2%, PP 99.0%, BP 36.5% 로 나타나 MP, EP, PP의 경우 대부분의 소변시료에서 검출되었다. 검출된 농도 범위(평균)는 MP 3.1~7230(320.9) ng/ml, EP 0.2~1290(106.7) ng/ml, PP 0.3~1160(57.6) ng/ml, BP 0.5~351(23.6) ng/ml이었다. 어린이들도 다양한 파라벤류에 지속적으로 노출되고 있음을 시사한다. 대부분의 경우 Boberg 등[15]이 제시한 허용일일노출량(ADI)인 10mg/kg bw/day 이하의 농도를 보이지만 일부 고농도 노출의 경우 ADI 범위를 넘어설 수도 있었다. 파라벤류와 관련된 인체영향에 대한 우려가 증가되고 있는 만큼 소변에서의 파라벤류 측정 등 인체시료 분석을 통한 노출량을 평가하고, 노출원을 파악하여 과도한 노출이 일어나지 않게 관리할 필요성이 요구되고 있다.

V. 결 론

본 연구에서는 소변 중 파라벤류 분석을 위하여 온라인 고체상추출 방법의 유효성을 입증하고자 실제 소변시료를 이용하여 분석을 진행하고 오프라인 고체

상추출법과 비교하였다. 파라벤류의 LOD(LOQ)는 MP 0.6(2.1), EP 0.2(0.7), PP 0.2(0.9), BP 0.5(1.6) ng/ml로 나타났으며 MP, EP, PP의 경우 대부분의 시료에서 검출할 수 있었다. 또한, 정확도의 경우 98.3~106.4%, 정밀도의 경우 1.3~8.7% CV 값을 나타내어 생체시료 중 미량물질을 정량하기에 충분한 범위를 나타내었다. 온라인 고체상추출법에 의한 소변 중 파라벤류 분석결과는 기존의 오프라인 SPE 방법에 의한 분석 결과와 우수한 상관성(r>0.98)을 보여, 소변 중 파라벤류 검출을 위해 적절한 방법임을 입증하였다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 식품의약품안전청의 연구개발비(12161KFDA740)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Darbre PD, Aljarrah A, Miller WR, Coldham NG, Sauer MJ, Pope GS. Concentrations of Parabens in Human Breast Tumours, *J. Appl. Toxicol.* 2004; 24: 5-13.
2. Food and Drug Administraion, Available: Selected cosmetics ingredients > Parabens. http://www.fda.gov/Cosmetics/ProductandIngredientSafety/SelectedCosmeticIngredients/ucm128042.htm [accessed 28 October 2012].
3. Ye X, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM, Automated on-line column-switching HPLC-MS/MS method with peak focusing for measuring parabens, triclosan, and other environmental phenols in human milk, analytica chimica acta. 2008; 622: 150-156.
4. Kohl L, Blondeel A, Song M. Allergic contact dermatitis from cosmetics. Retrospective analysis of 819 patch-tested patients. *Dermatology.* 2002; 204: 334-337.
5. Jung JY, Narmandakh J, Hong JS, Eun HC. A study of the patch test results with preservative antigens for patients with suspected cosmetic contact dermatitis, *Korean J. Dermatol.* 2010; 48(2): 109-114.
6. Korea Food and Drug Administraion, Notification of amendments. Available: http://www.kfda.go.kr/index.kfda?mid=95&seq=2482&cmd=v [accessed 28 October 2012].
7. Korea Food and Drug Administration, Online pharmaceutical Library. Available: http://drug.kfda.go.kr/html/businessB_01.jsp?p_menuId=0502#1 [accessed 20 November 2012].
8. Danish center on endocrine disrupters, Evaluation of tebuconazole, triclosan, methylparaben and ethylparaben according to the Danish proposal for criteria for endocrine disrupters, 2012.
9. Lee SY, Lee SH. Effect of methyl paraven on the onset of puberty in immature female rats. *Sangmyung Univ. J. Natural Sci.* 2009; 20: 1-16.
10. Oishi S. Effects of butyl paraben on the male reproductive system in mice, *Arch Toxicol.* 2002; 76(7): 423-429.
11. Ye X, Kuklenyik Z, Bishop AM, Needham LL, Calafat AM, Quantification of the urinary concentrations of parabens in humans by on-line solid phase extraction-high performance liquid chromatography-isotope dilution tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B.* 2006; 844: 53-59.
12. FDA, Validation of analytical procedures: Methodology, recommended for implementation at step 7 of the VICH process on 22 October 1998 by the VICH steering committee(64. guidance for industry), FDA, DHHS, 1998.
13. Robinson JW, Frame EMS, Frame II GM, undergraaduate instrumental analysis 6th ed., Marcel Dekker; 2005. p.57.
14. Casas L, Fernndez MF, Llop S, Guxens M, Ballester F, Olea N, Irurzun MB, Rodrguez LSM, Riao I, Tardn A, Vrijheid M, Calafat AM, Sunyer J, Urinary concentrations of phthalates and phenols in a population of Spanish, pregnant women and children, *Environment International.* 2011; 37: 858-866.
15. Boberg J, Taxvig C, Christiansen S, Hass U, Possible endocrine disrupting effects of parabens and their metabolites, *Reproductive Toxicology.* 2010; 30: 301-312.
16. Ye X, Bishop AM, Reidy JA, Needham LL, and Calafat AM, Parabens as Urinary Biomarkers of Exposure in Humans, *Environ Health Perspectives.* 2006; 114(12): 1843-1846.
17. Shirai S, Suzuki Y, Yoshinaga J, Shiraishi H, Mizumoto Y, Urinary excretion of parabens in pregnant Japanese women, *Reproductive Toxicology.* 2012; in press.