

## HPLC를 이용한 p-아니식애씨드와 메칠파라벤의 분리 분석법 개발

김 일 현 · 류 대 훈 · 김 영 수 · 정 은 선 · 박 덕 훈<sup>†</sup>

바이오스펙트럼(주) 생명과학연구소  
(2014년 8월 18일 접수, 2014년 8월 29일 수정, 2014년 11월 14일 채택)

### Determination of p-Anisic Acid and Methylparaben by Using High Performance Liquid Chromatography

Il Hyun Kim, De Hun Ryu, Young Soo Kim, Eun Sun Jung, and Deok Hoon Park<sup>†</sup>

BioSpectrum Life Science Institute, Seongnam 462-807, Korea  
(Received August 18, 2014; Revised August 29, 2014; Accepted November 14, 2014)

**요약:** 본 연구에서는 합성보존제로 흔히 쓰이는 메칠파라벤과 방부효능을 가지는 천연추출성분인 p-아니식애씨드를 HPLC를 통해 분리분석 하는 방법을 개발하였다. 메칠파라벤과 p-아니식애씨드는 같은 분자량(152.15 g/mol)과 비슷한 구조, 같은 최대흡수파장(250 nm)을 보이기 때문에 HPLC로 분석 시 동일한 RT값(13.3 min)을 갖는다. 본 연구 저자들은 아세틸화 반응을 통해 메칠파라벤을 선택적으로 유도체화 한 후 C18 컬럼을 통해 분석했을 때 두 물질이 분리됨을 확인하였다. 아세틸화반응을 거치면서 메칠파라벤의 피크유지시간이 13.3 min에서 23.9 min으로 이동하였으며, 평균값은  $23.9 \pm 0.1$  min, 피크면적 값은  $5042882 \pm 4778$ 로 일정하게 나타났다. 또한 직선성의 평가에서 결정계수값은 0.9999658로 1에 가까운 값을 보였다. 시료의 검출 한계는  $1.47 \mu\text{g/mL}$ 이었고 정량한계는  $4.44 \mu\text{g/mL}$ 이었다. 결론적으로 본 연구를 통해 개발된 분석법은 화장품 분야에서 유사한 구조를 가진 보존제 분석에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

**Abstract:** In this study, we developed a HPLC method for the separation and analysis of methylparaben and p-anisic acid, which are commonly used as a synthetic preservative and natural preservative, respectively. Methylparaben and p-anisic acid have same molecular weight (152.15 g/mol), similar structure and same maximum absorption wavelength (250 nm), thus they showed same retention time (RT) value (13.3 min) in HPLC experiment. We observed that two substances are separated on C18 column after methylparaben was derivatized selectively through the acetylation reaction. Instead, RT of the acetylated methylparaben was moved to 23.9 min from 13.3 min. The average retention time was  $23.9 \pm 0.1$  min and peak area values was  $5042882 \pm 4778$ . In addition it showed a high linearity in the calibration curve with a correlation coefficient ( $R^2$ ) of 0.9999658. Detection and quantitation limits were  $1.47 \mu\text{g/mL}$  and  $4.44 \mu\text{g/mL}$ , respectively. In conclusion, the developed method can be useful for separation and analysis of preservatives with similar structure in cosmetic fields.

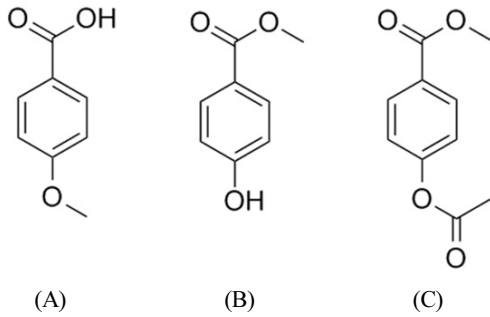
**Keywords:** methylparaben, p-anisic acid, high performance liquid chromatography, Acetylation, preservatives

## 1. 서 론

화장품은 다양한 재료의 혼합으로 제조되고, 또한

각각의 성분 및 이에 대한 제형상의 특성이 있기 때문에 미생물로부터 오염되기 쉽다. 미생물에 오염되면 제품의 품질이 떨어질 뿐 아니라 그 고유의 기능도 저하될 수 있어 보존상의 문제점을 해결하기 위하여 보존제를 사용한다. 메칠파라벤(methylparaben)과 같은 합성 보존제는 값이 싸고 광범위한 적용성 등으로 인하

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: pdh@biospectrum.com)  
call: 031)750-9400

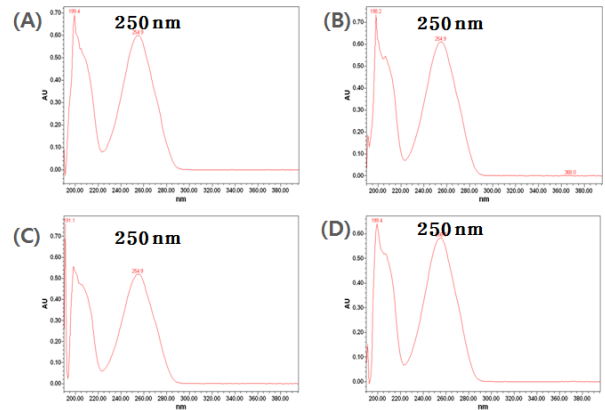


**Figure 1.** Structure of p-anisic acid (A), methylparaben (B) and methylparaben-AC (C).

여 세균이나 곰팡이, 효모 등의 미생물 증식을 억제하여 제품의 변질과 분해를 방지하기 위한 목적으로 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 사용되어지고 있다[1-4]. 그러나 최근 언론 등을 통해 이와 같은 화학적으로 합성된 보존제가 살아있는 세포에 영향을 주는 특정 화학적 작용기들을 지니고 있어 인체에 영향을 미칠 수도 있다는 가능성이 제기되면서[5], 사회적으로 이슈화되어 현재 대부분의 소비자들은 보존제의 안전성에 대하여 부정적인 견해를 지니고 있다. 특히 생체 방어 능력이 미약한 어린이나 노약자 등에 있어서는 보존제가 더 큰 영향을 미칠 수 있어 합성 보존제의 사용을 억제하고자 하는 노력이 많이 이루어지고 있다.

이러한 이유로 최근엔 식물에서 추출한 천연 보존제가 많이 개발되고 있다. 그중에서도 아니스(*Pimpinella anisum*) 식물에서 추출한 p-아니식애씨드(p-anisic acid)는 그람음성균, 그람양성균, 효모에 대해서 좋은 효과를 나타내고, 곰팡이에 대해서는 매우 뛰어난 효과를 가지고 있다고 알려져 있다[6]. 또한 p-아니식애씨드의 분석법에 관련하여서 이미 HPLC 분석법 및 밸리데이션이 이미 알려져 있다[7]. p-아니식애씨드를 주 성분으로 하는 대표적 보존제로는 Dermosoft<sup>®</sup> 1388 제품이 있다.

하지만 메칠파라벤과 p-아니식애씨드는 비슷한 구조(Figure 1)와 똑같은 UV spectrum (Figure 2. (A),(B))을 가지기 때문에 화장품 성분 분석에서 가장 많이 사용하고 있는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)를 통해서서는 분리가 쉽지 않다. 이를 극복하기 위해서 두 물질의 하이드록시기 유무의 차이를 이용해 하이드록시기와 선택적으로 결합하는 아세틸화 반응을 사용하기로 하였다. 따라서 본 연구에서는 그동



**Figure 2.** PDA spectrum of p-anisic acid (A), methylparaben (B), p-anisic acid-AC (C) and methylparaben-AC (D).

안 구조적 유사성으로 인해 분리 분석이 어려운 p-아니식애씨드와 메칠파라벤을 아세틸화(acetylation) 시켜 구조의 유사성을 없애 분리분석법을 확립하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 기기 및 시약

본 실험에서 메칠파라벤(Sigma, USA), p-아니식애씨드(Sigma, USA)를 표준품으로 사용하였고, 피리딘(Sigma, USA), 아세트산무수물(Sigma, USA)을 아세틸화 반응을 위해 사용하였으며, Dermosoft<sup>®</sup> 1388 (Dr.Straetmans, Germany)을 천연 보존제로 사용하였다. 그 외 실험에는 HPLC grade의 물(Burdick & Jackson, Korea), 메탄올(Burdick & Jackson, Korea) 및 아세토니트릴(Burdick & Jackson, Korea)을 사용하였다.

기기로는 항온수조(WB-10E, JEIO TECH, Korea)와, Waters 2695 Separations Module, Waters 2996 Photodiode Array Detector로 구성된 HPLC (Aliance HPLC system, Waters, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 아세틸화 반응

10 mL 부피의 유리 바이알 2개에 메칠파라벤과 p-아니식애씨드를 각각 30 mg씩 넣은 후 피리딘 2 mL 씩 넣어 잘 녹여주었다. 이후에 아세트산무수물 1 mL 를 넣고(최종 10000 µg/mL), 잘 섞이도록 충분히 흔들어 준 후 60 °C 항온수조에서 4 h 동안 반응시켰다[8].

**Table 1.** Analytical Condition for Preservatives by HPLC

Instrument	Waters 2695 Separation Module		
Detector	Waters 2996 Photodiode Array Detector (Range from 200 to 400 nm)		
Detection	254 nm		
Column	Phenomenex Luna C18(2) 4.6 × 250 mm, 5 μm		
Mobile phase	A: 0.1% Trifluoroacetic acid in Water B: Acetonitrile		
Gradient condition	Time (min)	A (%)	B (%)
	0	75	25
	5	75	25
	20	60	40
	25	55	45
	45	45	55
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	5 μL		

### 2.3. 분석 방법 및 밸리데이션

실험에서는 Waters Alliance HPLC system을 사용하여 Table 1과 같은 조건으로 분석하였다. HPLC를 이용한 분석법의 타당성을 검토하는 밸리데이션은 특이성, 직선성, 검출한계와 정량한계를 이용하여 검토하였다[9-10].

#### 2.3.1. 특이성

특이성은 시료 내 불순물, 분해물 및 배합 성분 등의 혼재상태에서 분석대상물질을 선택적으로 정확하게 측정할 수 있는 능력을 말한다. 아세틸화 반응이 완료된 메칠파라벤(이하 메칠파라벤-Ac)과 메칠파라벤 표준품을 비교하여 유도체화 되었음을 확인함과 동시에 변화된 메칠파라벤-Ac의 면적이 정량적으로 늘어나는지의 여부를 검토하였다.

#### 2.3.2. 직선성

메칠파라벤 표준품 0.1 g을 정밀하게 달아 100 mL 메스플라스크에 넣고 메탄올을 넣어 녹여 100 mL에 맞추어 주었다(1000 μg/mL). 이 액을 5배, 10배, 20배, 50배, 100배 희석하여 200 μg/mL, 100 μg/mL, 50 μg/mL, 20 μg/mL, 10 μg/mL, 1 μg/mL의 농도로 만들

었다. 이후 각각의 용액을 10 mL 부피의 유리 바이알에 1 mL씩 넣고 피리딘 2 mL씩 넣어 잘 녹여주었다. 이후에 아세트산무수물 1 mL를 넣고 잘 섞이도록 충분히 흔들어 준 후 60 °C 항온수조에서 4 h 동안 반응시켰다. 작성된 검량선으로부터 직선의 결정계수(기준 :  $R^2 = 0.995$  이상)를 구하여 직선성을 검토하였고 3번 반복 실험하여 평가하였다.

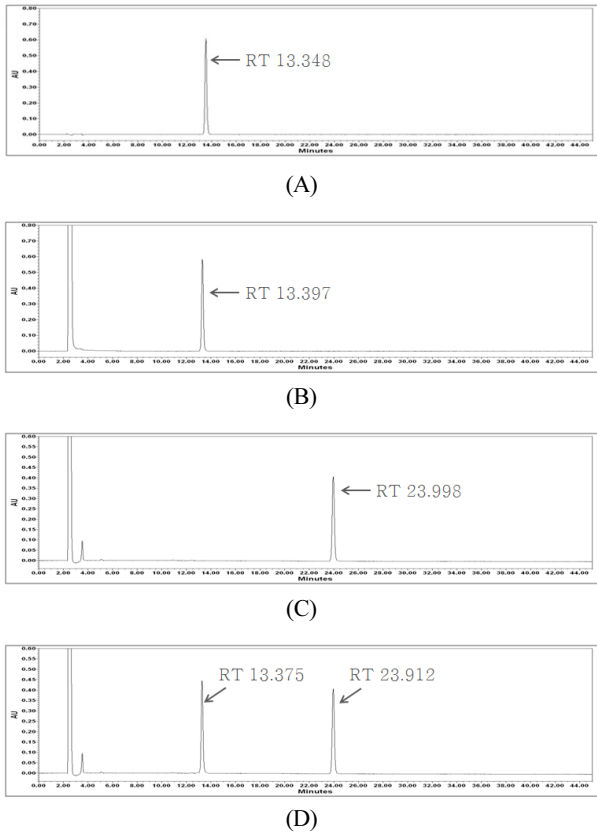
#### 2.3.3. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

검출한계는 시료분석법과정으로 배경 노이즈와 확실하게 구분되어지는 분석물질의 최저농도를 말하는 것으로 시료 대 잡음 비율(S/N ratio, signal to noise ratio)이 3일 때로, 정량한계는 적합한 정밀성과 정확성으로 정량적으로 실측될 수 있는 시료 내 분석물질의 최저량을 말하는 것으로 S/N ratio가 10일 때로 표준편차와 표준 검량선의 기울기를 이용하여 계산하였다.

$$\text{검출한계} = 3.3 \times \sigma/S \quad (S/N = 3)$$

$$\text{정량한계} = 10 \times \sigma/S \quad (S/N = 10)$$

이때  $\sigma$ 는 절편의 평균표준편차이며, S는 기울기의 평균을 의미한다.



**Figure 3.** HPLC chromatogram of methylparaben, p-anisic acid and Methylparaben-Ac (A) Methylparaben and p-anisic acid. (B) p-Anisic acid after acetylation reaction. (C) Acetylated methylparaben. (D) p-Anisic acid and methylparaben after acetylation reaction.

#### 2.4. 시중 보존제 원료의 분석

시중에 판매되고 있는 천연 보존제인 Dermosoft<sup>®</sup> 1388 제품은 천연 방부성분인 레블리닉애씨드(levulinic acid)와 p-아니식애씨드를 주성분으로 한다. 제품 1 mL와 메칠파라벤 표준품(1000 µg/mL) 1 mL를 10 mL 바이알에 넣은 후 피리딘 2 mL씩 넣어 잘 녹여주었다. 이후에 아세트산무수물 1 mL를 넣고 잘 섞이도록 충분히 흔들어 준 후 60 °C 항온수조에서 4 h 동안 반응시켰다. 이후 Table 1의 조건을 이용하여 HPLC 분석을 하였고, 이를 통해 아세틸레이션 반응이 p-아니식애씨드 함량분석에 영향을 나타내는지 검토하고자 하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 메칠파라벤-Ac와 p-아니식애씨드 분석

메칠파라벤과 p-아니식애씨드를 분리하기 위해서 두 물질을 모두 아세틸화 반응을 해준 후 HPLC를 이용하여 분석하였다. 반응 전에 메칠파라벤과 p-아니식애씨드는 13.3 min의 동일한 피크 유지시간에 나타나 분리가 이루어지지 않은 것을 확인하였으며(Figure 3 (A)), p-아니식애씨드는 아세틸화 반응에 필요한 하이드록시기를 가지고 있지 않기 때문에 HPLC 상에서 RT 값의 변화가 없었다(Figure 3 (B)). 하지만 메칠파라벤은 하이드록시기에 아세틸기가 결합하여 아세틸화 됨으로써 물질의 극성도가 달라져 23.9 min으로 확실한 피크 유지시간 값의 변화를 보였다(Figure 3 (C)). 또한 비교를 위하여 p-아니식애씨드와 메칠파라벤을 1:1 비율로 섞은 용액은 서로 방해 없이 크로마토그램에서 잘 분리가 되어 13.3 min과 23.9 min에 나타났다(Figure 3 (D)).

#### 3.2. 특이성

메칠파라벤 표준품과 메칠파라벤-Ac의 크로마토그램을 분석한 결과 표준액에서 메칠파라벤, 메칠파라벤-Ac의 피크 유지시간은 각각 13.3 min과 23.9 min이었다. 또한 아세틸화 반응이 이루어졌다 하여도 물질의 최대흡수파장과 UV 스펙트럼의 변화는 없다는 것을 알 수 있었다(Figure 2 (A~D)). 기지농도의 표준품으로 spiking한 시험용액의 크로마토그램에서 보존제의 피크유지시간이  $23.9 \pm 0.1$  min이고, 피크면적값이  $5042882 \pm 4778$ 로 일정하게 나타나는 것으로 보아 시료의 다른 성분들과 명확하게 분리할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

#### 3.3. 직선성

직선성의 평가는 메칠파라벤-Ac의 1 µg/mL에서 작업 농도를 포함 200 µg/mL의 농도 범위에서 실시하여 검량선을 Figure 4와 같이 나타내었다. 직선의 결정계수는 0.9999658로 USP 가이드라인에 따라 0.995의 허용 기준보다 높았다.

#### 3.4. 검출한계(LOD)와 정량한계(LOQ)

메칠파라벤-Ac의 검출한계와 정량한계를 구하였다.

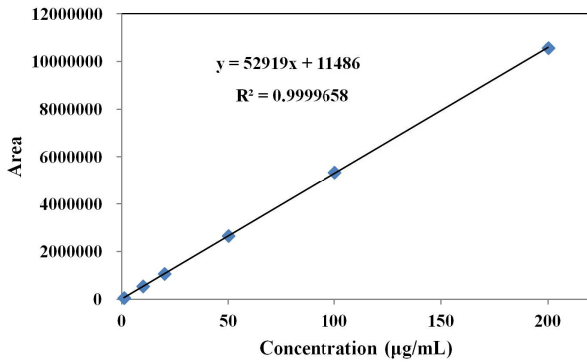


Figure 4. Calibration curve of methylparaben-Ac.

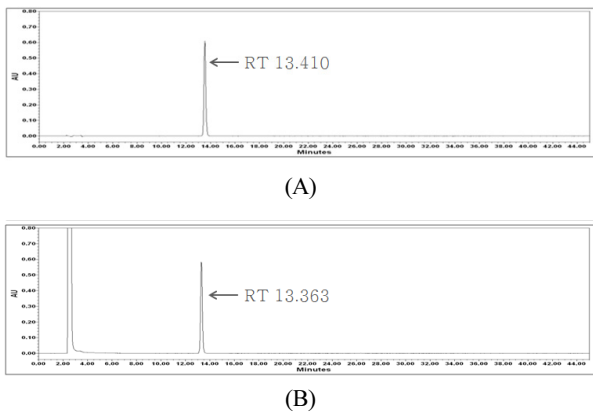


Figure 5. HPLC chromatogram of Dermosoft® 1388 and Dermosoft® 1388 after acetylation reaction. (A) Dermosoft® 1388. (B) Dermosoft® 1388 after acetylation reaction.

검출한계는 1.47 µg/mL이었고 정량한계는 4.44 µg/mL로 확인할 수 있었다.

### 3.5. 시중 보존제 원료의 분석

Dermosoft® 1388 제품을 아세틸화 반응시키기 전후의 HPLC를 분석한 결과 Figure 5와 같이 나타났다. 반응하기 전 제품의 크로마토그램(Figure 5 (A))은 p-아니식애씨드인지 메칠파라벤인지 구분이 불가능하나, 반응 후 크로마토그램(Figure 5 (B))에서 피크 유지시간의 변화가 없는 것을 보았을 때 p-아니식애씨드임을 알 수 있었으며, 표준품을 이용한 정량 결과 5.0%로 아세틸화 반응이 p-아니식애씨드의 함량에는 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

## 4. 결 론

전처리 없이 HPLC를 이용한 분리가 불가능했던 메칠파라벤과 p-아니식애씨드를 메칠파라벤만을 선택적으로 아세틸화 반응을 시켜 메칠파라벤의 극성도를 비극성화 시킴으로써 HPLC 분석 시 C18 컬럼에서 피크 유지시간이 반응 전보다 뒤로 나오게 하였으며 이를 이용하여 두 물질의 분리가 본 연구를 통해 가능해졌다. 메칠파라벤의 아세틸화 반응 후 반응하지 않은 메칠파라벤은 검출한계 이하로 검출되지 않았으며, 메칠파라벤-Ac의 밸리테이션을 통해 메칠파라벤과 확실히 구별 가능함을 보였다. 결과적으로 메칠파라벤과 p-아니식애씨드의 분석은 따로 진행할 필요가 없으며, 간단한 아세틸화 반응을 통해 두 가지 모두 정량이 가능해졌다. 실제로 시중에 판매 중인 제품을 이용하여 분석한 결과 아세틸화 반응을 통해 메칠파라벤과 p-아니식애씨드의 분석이 확실히 구분되어짐이 확인되어, 이를 바탕으로 천연보존제와 합성보존제의 분석에 있어 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

## Acknowledgements

본 연구는 산업통상자원부 산업협력권사업 과제에 지원에 의해 수행된 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다(과제번호: R0002895).

## Reference

1. G. A. Shabir, Determination of combined p-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**, 207 (2004).
2. N. Memon, M. I. Bhangar, and M. Y. Kuhuawer, Determination of preservatives in cosmetics and food samples by micellar liquid chromatography, *J. Sep. Sci.*, **28**, 635 (2005).
3. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto, and M. Nishida, Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography, *J. Pharm.*

- Biomed. Anal.*, **28**, 261 (2002).
4. M. R. Lee, C. Y. Lin, Z. G. Li, and T. F. Tsai, Simultaneous analysis of antioxidants and preservatives in cosmetics by supercritical fluid extraction combined with liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. Anal.*, **1120**, 244 (2006).
  5. E. J. Routledge, J. Rarker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 12 (1998).
  6. S. Papageorgiou, A. Varvaresou, E. Tsirivas, and C. Demetzos, New alternatives to cosmetics Preservation, *J. Cosmet. Sci.*, **61**, 107 (2010).
  7. D. Wen, C. Li, H. Di, Y. Liao, and H. Liu, A universal HPLC method for the determination of phenolic acids in compound herbal medicines, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(17), 6624 (2005).
  8. T. G. Bonner and P. McNamara, The pyridine-catalysed acetylation of phenols and alcohols by acetic anhydride, *J. Chem. Soc. B*, 795, (1968).
  9. U. S. Pharmacopeia National Formulary, USP 26-NF 21, 3th Ed., Mack Printing Company, 2439 (2003).
  10. C. M. Reiley and F. Fell, Development and validation of analytical methods, *Prog. Pharm. Biomed. Anal.*, **3**, 20 (1996).