

간편한 DNPH 유도체화 HPLC 분석법을 이용한 화장품 중 포름알데하이드 분석

최 종 근[†]

청운대학교 화장품학과

(2015년 12월 22일 접수, 2016년 2월 24일 수정, 2016년 3월 15일 채택)

Determination of Formaldehyde in Cosmetics Using a Convenient DNPH Derivatization Procedure Followed by HPLC Analysis

Jongkeun Choi[†]

Department of Cosmetic Science, Chungwoon University, 25, Daehak-gil, Hongseong-eup, Hongseong-gun, Chungnam-do 32244, Korea

(Received December 22, 2015; Revised February 24, 2016; Accepted March 15, 2016)

요 약: 대한민국 식품의약품안전처(식약처)는 포름알데하이드 분석법으로 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) 유도체화-고성능액체크로마토그래프법(HPLC)을 고시하고 있다. 본 연구는 고시법의 복잡한 시료 전처리 과정을 개선하여 화장품 분석에 편리하게 사용할 수 있는 유도체화법을 개발하고자 수행되었다. 전처리법을 간단하게 하기 위하여 pH, 시간 및 온도 등 반응조건을 최적화하였다. 이 전처리법은 초산염 완충액(pH 5.0)을 사용한 검액의 pH 조정, 디클로로메탄을 사용한 액-액 분획 그리고 감압농축기를 사용한 증발건조와 같이 식약처 고시법의 복잡한 과정이 필요 없다. 유도체화 과정을 통하여 생성된 formaldehyde dinitrophenylhydrazone (formaldehyde-DNP)는 식약처의 시험방법을 약간 변형한 역상 HPLC법으로 분리하고 정량하였다. 2 ~ 40 ppm 농도 범위의 표준액들을 가지고 수행한 검량선 작성 결과, 본 시험법은 상관계수 값이 0.9999로 좋은 직선성을 보여주었다. 본 실험의 최소검출한계(LOD)와 최소정량한계(LOQ)는 각각 0.2 ppm과 0.5 ppm이었다. 또한 회수율 실험결과는 실험방법이 매우 정확하고 재현성이 높음을 보여주었다. 따라서 본 연구에서 제안된 시험법은 화장품 중 포름알데하이드를 신속하게 분석하는데 적용될 수 있을 것이다.

Abstract: Korea Food and Drug Administration (KFDA) has officially announced 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization - high performance liquid chromatography (HPLC) methods for analysis of formaldehyde. This study was conducted to develop a convenient derivatization method for cosmetics by improving complex pre-treatment procedures included in KFDA method. To simplify pre-treatment procedures of KFDA method, reaction conditions including pH, time and temperature were optimized. This pre-treatment method does not require complicate pre-treatment steps of KFDA method such as pH adjustment of test solution with acetate buffer (pH 5.0), solvent-solvent partitioning with dichloromethane and concentrating procedure with vacuum evaporator. Formaldehyde-dinitrophenylhydrazone (formaldehyde-DNP) product produced by derivatization reaction was separated and quantified with a reversed-phase HPLC, which was slightly modified with KFDA method. The linearity test showed good results with 0.9999 of correlation coefficient (r^2) in the range of 2 ~ 40 ppm of standard solutions. In this method, limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) values for formaldehyde were 0.2 ppm and 0.5 ppm, respectively. In addition, recovery test demonstrated that the method was also accurate and reproducible. Therefore, the proposed method can be applicable to rapid analysis of formaldehyde in cosmetics.

Keywords: cosmetic, 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), formaldehyde, pre-column derivatization, HPLC

[†] 주 저자 (e-mail: jkchoi@chungwoon.ac.kr)
call: 042)630-3198

1. 서 론

포름알데하이드(CAS No. 50-00-0, HCHO)는 분자량이 30.03 g/mol로 알데하이드 중 가장 작다. 녹는점은 $-92\text{ }^{\circ}\text{C}$ 이고 끓는 점은 $-21\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 자극적인 냄새가 나는 가연성 기체이다. 포름알데하이드는 물에 대한 용해도(400 g/L)가 매우 크기 때문에 산업적으로는 물에 녹이고(35 ~ 37%) 중합 방지를 위해 메탄올을 8 ~ 12% 첨가하여 사용하는데 이 액을 포르말린이라고 한다. 포름알데하이드는 페인트, 접착제 등 산업용 수지에 배합되는 주요 원료이다. 포름알데하이드가 첨가된 수지는 접착력이 우수하고 내열성이 있어 합판이나 가구의 제작에 사용될 뿐만 아니라 유리 섬유나 석면 섬유의 단열재에 사용된다. 포름알데하이드는 불쾌감, 두통, 수면장애, 오심, 식욕감소를 일으킨다. 가역적인 기관지 수축은 천식과 유사한 증상을 나타낼 뿐만 아니라 면역 반응을 지연시킨다. 포름알데하이드는 새로 이사한 다음 두통, 비염, 호흡곤란, 천식, 피부염 등의 증상이 나타나는 새집증후군의 원인 물질 중에 하나이다[1-3]. 또한 피부에 노출될 경우 포름알데하이드는 피부 자극, 접촉성 피부염 및 알러지를 유발하는 것으로 알려져 있다. 역학 연구에 의하면 포름알데하이드는 비인두암, 혈액암, 비강암을 일으킬 수 있음도 밝혀졌으며, 동물 실험에서 포름알데하이드를 흡입 노출시키면 상피세포암이, 경구로 노출시키면 소화기계 암이 발생하였다[4,5]. 따라서 국제암연구소에서는 인간에게 암을 유발하는 1급 발암물질로 분류하고 있다.

화장품에는 과거 포름알데하이드 자체를 살균, 방부제로 사용했을 뿐만 아니라 quaternium-15, imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, dimethyloldimethyl hydantoin 그리고 2-bromo-2-nitropropane-1,3-diol과 같이 분해되어 천천히 포름알데하이드를 유리하는 살균, 방부제를 많이 사용하였다[3]. 하지만 현재는 미국을 제외한 대부분의 국가에서 포름알데하이드의 배합을 금지하고 있으며 검출 허용 한도로 규제하고 있다[3]. 대한민국 식품의약품안전처(식약처)에서도 포름알데하이드를 배합 금지성분으로 지정하였으며, 의도하지 않았지만 제조 공정 중 혹은 유통 중에 생성되어 기술적으로 제거가 불가능한 포름알데하이드의 검출한도를 0.2%이하로 규정하고 있다. 또한 0.05%를 초과하는 제품에 대해서도 해당 제품에 경고 문구를 표시하도록 하고 있다.

포름알데하이드를 분석하는 방법은 다양하여 여러 종류의 시액과 반응하여 색깔을 띠는 유도체를 만들고 흡광도를 측정(비색법 혹은 흡광광도법)[6,7]하거나 형광을 측정하는 방법[8] 등이 있다. 하지만 유도체를 고성능액체크로마토그래프(HPLC)[9-12], 기체크로마토그래프(GC)[13] 또는 모세관전기영동법(CE)[14]으로 분리하여 매트릭스 성분의 방해를 받지 않고 정량하는 방법 등이 흔히 사용된다. 최근 흡광광도법은 연속흐름 방식[15]으로 발전하였으며 HPLC 및 GC는 질량분석기[16]를 검출기로 사용함으로써 특이성 및 정량한계 면에서 커다란 향상이 있었다. 유도체 시약으로는 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH)[9-11] 및 acetylacetone[17]이 가장 많이 사용되고 있으며 ethyl-3-oxobutanoate[12], 2,4-pentanedione[18], acetoacetanilide[9], ammonium sulfate[14] 등이 알려져 있다. 최근 dimethylhydrazine[19] 및 ethoxyamine hydrochloride[20]으로 분석한 예도 보고되어 있다.

한편 식약처에서는 화장품 중 포름알데하이드를 DNPH와 반응시킨 다음 HPLC로 정량하는 표준분석법을 고시하였다. 이 방법은 시료를 초산·초산나트륨완충액으로 추출한 다음 액의 pH를 5.0으로 조정하고 DNPH로 반응시키는 과정을 거친다. 반응액은 디클로로메탄으로 2번 추출한 다음 감압농축기로 증발 건조하고 아세토니트릴에 녹여 HPLC로 분석하도록 하고 있다. 하지만 고시법은 시료의 전처리 단계가 복잡하고 여러 기구를 사용해야 하며 포름알데하이드 유도체를 추출할 때 상대적으로 몸에 해로운 디클로로메탄을 사용하는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 DNPH와 포름알데하이드의 반응조건을 최적화하여 간단한 전처리 후 HPLC로 분석할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 먼저 pH, 반응시간, 반응온도, 반응시액의 양 및 용매 등의 반응조건을 최적화하여 간편한 전처리법을 개발하였다. 또한 표준액 및 검액을 확립된 전처리법으로 처리하고 식약처의 고시법을 약간 변형한 HPLC 조작조건으로 측정하여 분석법을 밸리데이션하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 재료 및 기기

추출 및 크로마토그래피에 사용한 아세토니트릴 및 물은 HPLC급(대정화학, Korea)을 사용하였으며 4%

DNPH-phosphoric acid, acetic acid 및 sodium acetate는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하였다. 4% DNPH-phosphoric acid 1 mL에 아세트니트릴 8 mL 그리고 물 1 mL를 넣어 0.4% DNPH-인산액을 조제하여 유도체화 시액으로 하였다. 반응액의 pH를 조절하기 위한 2 M 초산나트륨액은 초산나트륨(Sigma, USA) 1.64 g을 정확히 달아 물을 넣어 녹여 10 mL로 하여 조제하였다. HPLC는 996 PDA 검출기가 부착된 Waters (USA)의 Alliance 2690 혹은 Micromass Quattro Micro LC/MS/MS system을 갖춘 Waters (USA)의 Alliance 2795를 사용하였다. 초음파처리는 Branson Ultrasonics사(USA)의 Sonifier 450을 사용하였다.

2.2. 표준액 및 검액의 준비

100 mL 용량플라스크에 검체 1.0 g을 정밀하게 달아 물 70 mL를 넣고 초음파 처리하여 잘 분산시킨 다음, 물을 넣어 표선까지 채우고 0.45 μm 멤브레인필터로 여과하여 검액으로 하였다. 따로 100 mL 용량플라스크에 37% 포름알데하이드 0.27 g을 정밀하게 달고 물을 표선까지 채워 표준원액으로 한 다음, 이 액 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mL를 정확히 취하고 물을 넣어 100 mL로 한 액을 검량선 작성용 표준액으로 하였다. 따라서 표준액의 포름알데하이드 농도는 각각 1, 2, 5, 10, 20 및 40 ppm이었다.

2.3. 유도체화

2 mL 용량의 바이얼에 표준액 및 검액 700 μL 씩을 각각 취하고 유도체시액으로 0.4% DNPH-인산액을 넣어 유도체화하였다. 조건에 따른 반응의 진행 정도를 평가하기 위하여 pH (1.9 ~ 5.8), 유도체시액의 양(10 ~ 100 μL), 반응온도(4 ~ 50 $^{\circ}\text{C}$), 반응시간(0 ~ 60 min) 및 용매의 종류(메탄올, 에탄올, 이세토니트릴)를 달리하여 반응시킨 다음 아세트니트릴 700 μL 씩을 넣어 희석하고 HPLC에 주입하였다.

2.4. 기기의 조작조건

식약처의 고시 방법을 변형하여 HPLC의 조작조건을 설정하였다. 물질 분리에 사용된 컬럼은 Dionex사(USA)의 Acclaim[®] 120 C18 Analytical (4.6 \times 250 mm, 5 μm) 컬럼이었으며, 이동상으로 0.3% 초산수용액과 아세트니트

릴을 40 : 60 비율로 섞어 1.0 mL/min 유량으로 흘렸다. 이때 주입량은 10 μL 이었으며 분석시간은 15 min이었다. Formaldehyde-dinitrophenylhydrazone (Formaldehyde-DNP) 유도체는 photodiode array (PDA) 검출기로 검출하였으며 검출파장은 355 nm로 설정하였다.

2.5. 분석법 밸리데이션

표준원액을 희석하여 조제한 6종의 표준액 700 μL 를 2 mL 용량의 바이얼에 각각 취하고 0.4% DNPH-인산액 100 μL 를 넣고 잘 흔들어 섞은 다음 700 μL 아세트니트릴을 넣어 희석하였다. 상온에서 30 min 동안 방치하여 유도체화를 완료한 다음 이액 10 μL 를 가지고 분석조건에 따라 주입하고 검량선을 작성하였다. 또한 분석법의 정확도를 평가하기 위하여 포름알데하이드를 첨가한 검체들을 이용하여 3회 반복 실험하여 회수율을 구하였다. 회수율을 위한 검체는 스킨, 로션 및 크림 형태의 시중 제품으로 100 mL 용량플라스크에 각각 1.0 g의 검체를 취하고 표준원액 1 mL를 넣은 다음 약 70 mL의 물을 넣고 10 min 동안 초음파 진탕하였다. 물로 표선까지 채워 검액으로 한 다음 표준액과 동일한 방법으로 유도체화하고 필요에 따라 0.45 μm 필터로 여과한 액 10 μL 를 가지고 HPLC 분석조건에 따라 시험하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 유도체화 반응에 미치는 인자

본 연구에서는 고시법의 불편한 점을 개선하고자 HPLC의 자동주입기에서 통상 사용하는 2 mL 용량의 바이얼에서 유도체화 반응시킨 다음 필요에 따라 여과하고 바로 주입하는 것을 기본으로 하였다. 또한 반응에 영향을 주는 인자를 최적화하여 전처리 단계와 소요 시간을 최소화하고 상대적으로 몸에 해로운 디클로로메탄을 사용하여 추출하고 감압농축기로 농축하는 과정과 pH meter를 사용하여 pH를 정확히 5.0으로 조정하는 단계를 없애고자 하였다. 따라서 우선적으로 DNPH와 포름알데하이드의 반응에 미치는 인자에 대해서 알아보기 위하여 반응액의 pH, 반응시간, 반응온도에 변화를 주어 유도체화하고 HPLC로 분리한 다음 formaldehyde-DNP 피크의 면적을 비교하였다. 기기 조

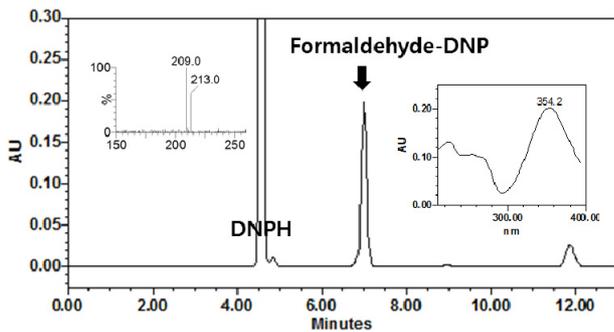


Figure 1. Chromatogram of 10 ppm formaldehyde after derivatization with DNPH. UV/Vis and mass spectra of formaldehyde-DNP are also shown in the chromatogram.

작 조건은 재료 및 방법에 언급한 것과 같이 식약처 고시법을 약간 변형하였다(Figure 1). Formaldehyde-DNP 피크의 확인은 UV/Vis 스펙트럼을 문헌과 비교하고 LC/MS의 질량스펙트럼에서 분자이온 피크 [M-H]⁻ (negative ion mode)가 209임을 확인하였다.

식약처 고시법은 미국의 EPA815A 시험법과 유사하게 포름알데하이드의 추출 및 유도체화 과정에서 검액은 항상 초산나트륨완충액으로 pH를 5.0으로 유지하도록 하고 있다. 또한 Bicking과 Cooke는 포름알데하이드와 DNPH의 반응에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과, 산성 조건에서 수율이 높을 것으로 예상하였으나 예상과 달리 약산성(pH 5.0)에서 수율이 가장 높았다고 보고하였다[21]. 그리고 이와 유사하게 아세트알데하이드의 최적의 반응 pH가 4.0이었다는 보고도 있다[22]. 이것은 포름알데하이드와 DNPH의 반응이 가역적 반응이고 생성된 formaldehyde-DNP가 산성조건에서 역반응으로 진행하기 때문이라고 설명하고 있다. 하지만 Figure 2의 반응식에서와 같이 유도체화 반응이 산 촉매 반응이므로 산성 조건에서 반응속도가 빠르며 pH와 화학 평형과는 무관할 것으로 예상된다. 실제로 산성조건(pH 1.8)에서 반응을 진행하고 분석한 논문도 여러 편이 보고되었다[16, 23-25]. 한편 pH 6.0에서 유도체화한 사례도 있다[11]. 따라서 우선적으로 반응 평형에 미치는 pH의 영향을 조사하였다(Table 1). 반응액의 pH는 0.4% DNPH-인산액에 2.0 M 초산나트륨액의 양을 다르게 첨가하여 1.88에서 5.67까지 9단계로 조정하였다. 이때 반응온도는 40 °C였으며 30 min 반응시켰다. Table 1에 나타난 것과 같이 모두 거의 동일한 피크 면적을 보였다. 따라서 반응 용매의 pH가 반

Table 1. Effect of pH on Derivatization Reaction

pH	Peak area	Relative peak area
1.88	1643771	1.00
2.15	1661255	1.01
2.86	1652800	1.01
4.17	1646972	1.00
4.75	1641792	1.00
4.88	1637956	1.00
5.09	1632544	0.99
5.26	1630242	0.99
5.67	1663949	1.01

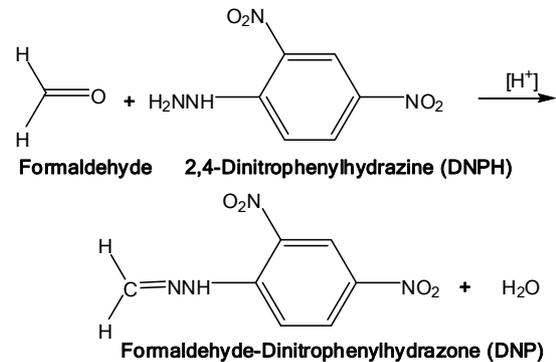


Figure 2. Reaction of formaldehyde with DNPH.

응에 미치는 영향은 크지 않아 이후 실험에서는 유도체화 반응에서 pH를 조정하지 않았다. 이것은 고시법에 비하여 반응 용액의 부피가 작아 상대적으로 높은 농도에서 반응이 일어나기 때문인 것으로 생각된다.

반응 종결시간을 결정하기 위하여 상온과 40 °C에서 반응시간을 달리하여 반응시키고 formaldehyde-DNP 피크의 면적을 비교하였다(Figure 3). 시료는 10 ppm 표준액 700 μL에 0.4% DNPH-인산액 50 μL를 넣고 잘 섞어 준 다음 시간을 달리하여 반응시키고 아세트니트릴 700 μL로 희석하여 준비하였다. pH 조절을 위한 2.0 M sodium acetate의 첨가는 없었다. Figure 3에 나타난 것과 같이 60 min까지 반응을 시켰을 때 40 °C에서 5 min 반응시킨 것은 60 °C의 100.1%로 5 min 안에 반응이 완결되었다. 상온의 경우에도 5 min 반응시킨 것은 40 °C 60 min의 97.6%였으며 20 min에서는 99.7%로 20 min 반응으로도 반응이 종결됨을 확인할 수 있었다.

위 결과 반응속도가 빨라 온도에 따른 반응 속도의 차이가 크지 않을 것으로 예측되어 반응 온도를 달리하여 피크의 면적을 확인하였다(Table 2). 이때 반응시

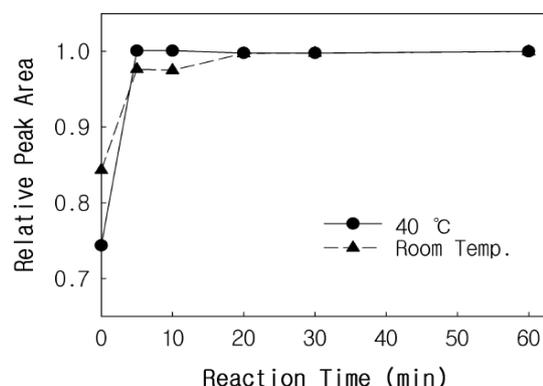
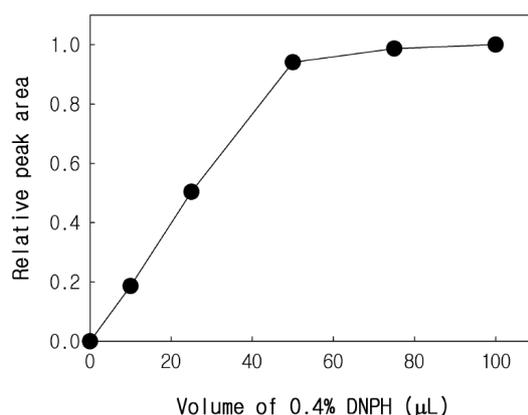
Table 2. Effect of Temperature on Derivatization Reaction

Reaction temp. (°C)	Peak area	Relative peak area
4	1703884	0.99
Room Temp.	1736566	1.01
30	1703918	0.99
40	1717155	1.00
50	1712030	1.00

간은 30 min이었으며 첨가한 반응액의 비는 앞과 동일하다. Table 2에 나타낸 것과 같이 결론적으로 반응온도에 관계없이 30 min 동안의 반응으로 충분함을 확인할 수 있었다. 따라서 이후 실험에서는 상온에서 30 min을 반응시키는 것으로 하였다. 즉, 반응 온도를 40 °C로 규정하고 있는 식약처 고시법에 비하여 본 시험 조건이 편리하다고 할 수 있다. 이것은 앞에 언급한 것과 같이 상대적으로 높은 농도와 산성조건에서 반응시키기 때문인 것으로 생각된다.

유도체화를 이용한 분석에서는 분석물에 비하여 과량의 유도체 시약을 첨가하여 반응이 완결되도록 하는 것이 중요하다. 따라서 검량선 작성 범위에서 최고 농도로 예상되는 40 ppm의 포름알데하이드 표준액을 가지고 0.4% DNPH-인산액의 양을 달리하여 30 min 동안 반응시키고 HPLC로 분석하였다(Figure 4). 0.4% DNPH-인산액의 양이 증가함에 따라 50 μ L까지는 직선적으로 피크의 면적이 증가하였으며 50 μ L 이상에서는 거의 증가하지 않았다. 이때 포름알데하이드는 0.93 μ M이며 DNPH는 1.0 μ M이었다. 즉, 포름알데하이드와 DNPH가 1 : 1로 반응함을 확인할 수 있었으며, 만일 포름알데하이드의 예상농도가 높을 경우 반응시액의 양 혹은 농도를 높여야 함을 예상할 수 있었다. 따라서 이 이후 실험에서는 0.4% DNPH-인산액을 충분히 과량으로 설정하기 위하여 100 μ L를 넣어 주었다.

포름알데하이드는 물에 매우 잘 녹으며 극성 용매에도 용해되는 성질이 있다. DNPH 그리고 그 유도체는 극성 용매에서는 잘 용해되나 물에서는 침전을 형성한다. 20 ppm 이상의 포름알데하이드 표준액을 물에서 유도체화하면 노란색 침전이 형성되는 것을 관찰할 수 있다. 따라서 반응이 종결된 다음에 HPLC에 주입하기 전에 아세트니트릴로 희석하여 녹이는 것이 필수적이다. 분석법을 간단하게 하기 위하여 반응 전에 미리 아세트니트릴로 희석하고 상온에서 30 min 동안 반응시

**Figure 3.** Influence of derivatization time on the peak area.**Figure 4.** Effect of the amount of 0.4% DNPH on derivatization reaction.

키는 것과 30 min 반응 후 아세트니트릴을 넣는 것을 비교한 결과, 10 ppm 표준액을 가지고 실험한 결과 피크의 면적은 각각 1801405 ± 40934 ($n = 3$)와 1784005 ± 47545 였다. 따라서 아세트니트릴의 희석 순서에 따른 피크 크기의 차이가 크지 않아 유도체화 방법을 700 μ L의 물 추출액(검액)에 100 μ L의 0.4% DNPH-인산액을 넣고 잘 흔든 다음 700 μ L의 아세트니트릴을 넣어 희석하고 30 min 간 상온에서 방치하는 것으로 정하였다.

크림과 로션은 오일과 왁스의 함량이 높아 물에 분산하기가 어려운 경우가 종종 있으며, W/O 형태의 유화 제형은 더욱 그러하기 때문에 종종 소량의 유기용매로 분산시킨 다음 물로 추출하는 것이 필요하다. 따라서 화장품 분석에서 흔히 사용하는 추출 유기용매인 메탄올, 에탄올, 아세트니트릴에서의 유도체화 반응 정도에 미치는 영향을 파악하기 위하여 1,000 ppm 포름알데하이드 표준원액을 각각의 용매에 희석하여 10

Table 3. Effect of Solvent on Derivatization Reaction

Solvent	Peak area	Relative peak area
Water	1728873	1.00
Methanol	1750788	1.01
Ethanol	1780735	1.03
Acetonitrile	1765179	1.02

Table 4. Effect of Storage Time on Stability of Formaldehyde-DNP

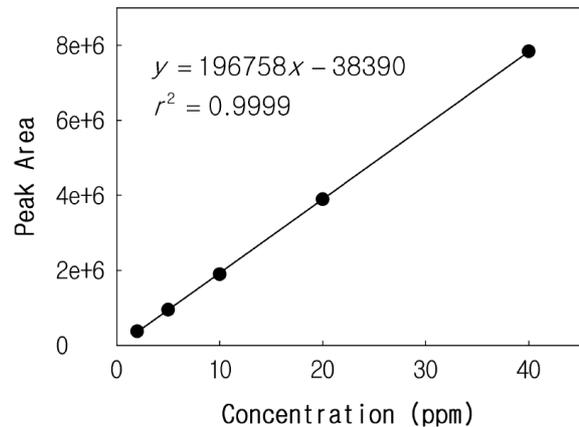
Time (h)	Peak area	Relative peak area
1	1753461	1.00
9	1778535	1.01
18	1790071	1.02
27	1791071	1.02
54	1788585	1.02

ppm으로 한 다음 유도체화 반응을 시키고 HPLC로 분석하였다(Table 3). 물에서 반응시킨 것에 대한 상대적인 피크의 면적은 모두 3% 이내로 실험오차를 감안한다면 반응용매는 반응에 영향을 주지 않는 것으로 생각된다. 그러므로 왁스나 오일의 함량이 높은 제품을 추출할 경우 유도체화 반응에 영향이 없는 메탄올, 에탄올 또는 아세토니트릴을 소량 첨가하여 제품을 분산한 다음 물로 희석하거나 이동상(물-아세토니트릴 혼합액)으로 추출하는 전처리법도 타당할 것으로 생각된다.

마지막으로 반응산물인 formaldehyde-DNP의 경시변화 즉 반응 종료 후 주입까지의 경과 시간에 따른 피크의 크기 변화를 확인하였다. 이는 많은 시료를 한꺼번에 전처리하고 밤샘 작업으로 분석할 때 필요하다. 10 ppm의 표준액을 앞에서와 같이 유도체화한 다음 54 h 경과할 때까지 5차례 분석할 결과 피크 면적에서의 차이는 3% 미만으로 미미하였다(Table 4). 따라서 대규모의 전처리 후 밤샘 작업으로 HPLC로 분석하는 것이 가능하다고 할 수 있다.

3.2. 분석법의 밸리데이션

앞의 반응조건 확립 실험 결과를 근거로 간편한 전처리법을 확립하고 분석법의 밸리데이션을 실시하였다. 우선 검액 700 μ L에 100 μ L의 0.4% DNPH-인산액을 넣고 잘 흔들어 준 다음 아세토니트릴 700 μ L로 희석하였다. 30 min 동안 상온에서 방치하여 반응이 완결되도록 하고 필요에 따라 여과한 액을 HPLC로 분석하였다. 만

**Figure 5.** Calibration curve of formaldehyde.

일 여과하기에 용액의 부피가 작다고 판단된다면 각 반응액의 부피를 2배 또는 3배로 하여도 무방하다.

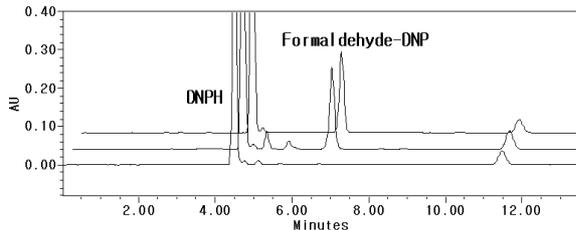
먼저, 표준액 2 ~ 40 ppm을 가지고 검량선을 작성하여 직선성을 확인하고 정량범위를 설정하였다. 이는 검체를 1 g을 취하여 100 mL의 물로 추출할 경우 검체에서의 정량이 가능한 농도 범위는 200 ~ 4,000 ppm에 해당한다. 따라서 식약처의 검출 허용한도기준(2,000 ppm) 및 함량 표시 의무 농도(500 ppm 이상)를 만족하는 범위이다. 실험결과 상관계수(r^2)는 0.9999로 매우 양호하였다(Figure 5). 신호 대 잡음(S/N)비가 3 이상을 최소검출한도(LOD)로, S/N 비 값이 10 이상을 최소정량범위(LOQ)로 설정한 다음 표준액을 차례로 0.2, 0.1, 0.05 그리고 0.02 ppm으로 희석하여 실험한 결과 LOD는 0.02 ppm이고 LOQ는 0.05 ppm이었다.

분석의 특이성, 정확도 및 재현성을 검증하기 위하여 회수를 시험(recovery test)을 행하였다. 서로 다른 제형을 갖는 세 종류의 제품을 선정하여 각각 1.0 g을 정밀하게 달아 100 mL 용량플라스크에 넣고 1,000 ppm 표준원액 1 mL를 첨가하였다. 여기에 물 70 mL를 넣고 초음파 진탕하여 충분히 분산시킨 다음 표준액까지 물로 채워 검액으로 하였다. 검액 700 μ L를 가지고 DNPH로 유도체화한 다음 HPLC로 분석하였다(Figure 6).

재료 및 방법에 나타낸 것과 같이 검출기의 파장은 355 nm이므로 상대적으로 파장이 길어 시료의 성분에 의한 방해는 작을 것으로 예측되었다. Figure 6에 나타낸 것과 같이 바탕시험(blank test)한 결과와 회수율 시험한 크로마토그램을 비교해 볼 때 예상했던 것처럼 매트릭스에 의한 방해는 거의 없는 것으로 드러났

Table 5. Recoveries (%) and Relative Standard Deviation (%) of Formaldehyde in the Samples (n = 3)

	Skin	Lotion	Cream	Cream
Extraction solvent	Water	Water	Water	Acetonitrile
Recovery	100.1 ± 0.055	101.5 ± 0.080	104.5 ± 0.381	103.2 ± 0.274

**Figure 6.** Selected HPLC chromatograms of blank (bottom), test (middle) and 10 ppm standard solutions (top) respectively. The test solution was spiked with formaldehyde standard solution prior to analysis.

며, 따라서 특이성이 우수하다고 할 수 있다. 회수율 실험결과 회수율은 101.5 ~ 104.5%를 보였다(Table 5). 로션, 스킨 제형에서는 100%에 가까운 값을 보였으며 크림은 상대적으로 오차가 커서 104.5%를 나타내었다. 이는 물로 추출할 경우 크림의 왁스나 오일 성분의 함량이 높아 물과 섞이지 않고 멎치는 것이 생기고 그만큼 추출 용액의 부피가 작아 나타난 것으로 생각된다. 따라서 이런 경우 내부표준물법을 이용하거나 왁스를 제거하고 물층만을 따로 모아 100 mL로 하는 것이 필요할 것으로 사료된다. 또한 식약처 고시법의 물 추출이 아닌 유기용매로 추출하는 것을 고려할 수 있으며 Table 5에 나타낸 것과 같이 아세토니트릴로 추출할 경우 회수율의 향상이 있음을 확인하였다. 밸리데이션 항목 중 재현성의 경우 회수율 실험을 3회 반복 실험한 결과 세 가지 제형 모두에서 표준편차가 0.4% 미만으로 매우 우수하였다. 재현성면에서도 크림제형에서 상대적으로 큰 값의 표준편차를 나타내었다.

4. 결 론

식약처 고시법의 단점을 개선하기 위하여 상온에서 0.4% DNPH-인산액과 포름알데하이드를 반응시키고 고시법에 있는 디클로로메탄 추출과 감압 농축과정 없이 바로 HPLC에 주입하여 분석하는 편리한 방법을 개발하

였다. 분석법을 밸리데이션한 결과, 특이성, 직선성 및 정확성(회수율)이 우수함으로 화장품 중 포름알데하이드를 신속하게 분석하는 것에 적용할 수 있을 것으로 사료된다. 확립된 실험방법을 정리하면 아래와 같다.

검체 1.0 g을 정밀하게 달아 물을 넣고 초음파 처리하여 충분히 분산시킨 다음 100 mL로 하고 여과하여 검액으로 한다. 따로 37% 포름알데하이드 표준품 0.27 g을 정밀하게 달아 물을 넣어 100 mL로 한 액을 표준원액으로 한다. 이 액 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 및 4.0 mL를 정확히 취하고 물을 넣어 100 mL로 한 액을 표준액으로 한다. 2 mL 용량의 바이얼에 표준액 및 검액 700 μ L씩을 각각 취하고 100 μ L의 0.4% DNPH-인산액을 넣고 잘 흔들어 준 다음 아세토니트릴 700 μ L로 희석한다. 30 min 동안 상온에서 방치하여 반응이 완결되도록 하고 필요에 따라 여과하여 전처리한 액 10 μ L씩을 가지고 다음 조작조건으로 액체크로마토그래프 절대검량선법에 따라 시험한다.

<조작조건>

검출기: 자외부흡광광도계(측정파장 355 nm) 혹은 다이오드어레이검출기(DAD)

칼 럼: Acclaim[®] 120 C18 (4.6 × 250 mm, 5 μ m) 혹은 동등한 칼럼

이동상: 0.3% 초산수용액 · 아세토니트릴 혼합액(40 : 60)

유 량: 1.0 mL/min

Acknowledgement

본 연구는 2013년도 청운대학교 학술연구조성비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

Reference

1. S. H. Sim and Y. S. Kim, Characterization and assessment of indoor air quality in newly constructed apartments – volatile organic compounds and formaldehyde –, *J. Env. Hlth.*, **32**(4), 275 (2006).
2. H. Choi, J. M. Choi, and W. J. Kim, Assessment of indoor volatile organic compounds (VOCs) and emission characteristics by humidity variation in new apartments, *J. Korean Soc. Living Environ. Sys.*, **13**(4), 283 (2006).
3. A. C. De Groot and M. Veenstra, Formaldehyde releasers in cosmetics in the USA and in Europe, *Contact Dermatitis*, **62**, 221 (2010).
4. W. D. Kerns, K. L. Pavkov, D. J. Donofrio, E. J. Gralla, and J. A. Swenberg, Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure, *Cancer Res.*, **43**(9), 4382 (1983).
5. R. A. Renne, K. M. Gideon, S. J. Harbo, L. M. Staska, and S. L. Grumbein, Upper respiratory tract lesions in inhalation toxicology, *Toxicol. Pathol.*, **35**(1), 163 (2007).
6. B. W. Bailey and J. M. Rankin, New spectrophotometric method for determination of formaldehyde, *Anal. Chem.*, **43**(6), 782 (1972).
7. P. Verma and V. K. Gupta, Spectrophotometric determination of formaldehyde in air, *Talanta.*, **30**(6), 443 (1983).
8. Q. Li, P. Stitharathikhun, and S. Motomizu, Development of novel reagent for Hantzsch reaction for the determination of formaldehyde by spectrophotometry and fluorometry, *Anal. Sci.*, **23**(4), 413 (2007).
9. R. K. Beasley, C. E. Hoffman, M. L. Rueppel, and J. W. Worley, Sampling of formaldehyde in air with coated solid sorbent and determination by high performance liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **52**(7), 1110 (1980).
10. K. Kuwata, M. Uebori, H. Yamasaki, Y. Kuge, and Y. Kiso, Determination of aliphatic aldehydes in air by liquid chromatography, *Anal. Chem.*, **55**(12), 2013 (1983).
11. C. Lv, J. Hou, W. Xie, and H. Cheng, Investigation on formaldehyde release from preservatives in cosmetics, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **37**(5), 474 (2015).
12. G. Burini and R. Coli, Determination of formaldehyde in spirits by high-performance liquid chromatography with diode-array detection after derivatization, *Anal. Chim. Acta*, **511**(1), 155 (2004).
13. R. T. Rivero and V. Topiwala, Quantitative determination of formaldehyde in cosmetics using combined headspace–solid-phase microextraction chromatography, *J. Cosmet. Sci.*, **55**(4), 343 (2004).
14. B. Deng, Y. Liu, H. Yin, X. Ning, H. Lu, L. Ye, and Q. Xu, Determination of ultra-trace formaldehyde in air using ammonium sulfate as derivatization reagent and capillary electrophoresis coupled with on-line electrochemiluminescence detection, *Talanta*, **91**, 128 (2012).
15. L. Bolognesj and E. J. dos Santos, Determination of formaldehyde by flow injection analysis with spectrophotometric detection exploiting brilliant green–sulphite reaction, *Chemical Papers*, **69**(6), 791 (2015).
16. C. Lv, J. Sun, and H. Cheng, Determination of formaldehyde residue in cosmetics by short-column high performance liquid chromatography with mass spectrometric confirmation, *Anal. Methods*, **7**, 1630 (2015).
17. K. C. Lee, J. H. Park, and W. Lee, Determination of trace amounts of formaldehyde in water using high performance liquid chromatography and acetylacetone as a Derivative Reagent, *J. Korean Soc. Environ. Eng.*, **37**(2), 81 (2015).
18. T. Nash, The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction, *Biochem. J.*, **55**(3), 416 (1953).
19. J. Zhao, F. Liu, G. Wang, T. Cao, Z. Guo, and Y. Zhang, High performance liquid chromatography determination of formaldehyde in engine exhaust with unsymmetrical dimethylhydrazine as a new derivatization agent, *Anal. Methods*, **7**, 309 (2015).

20. J. Zhao, G. Wang, T. Gao, and Z. Guo, Development of a novel derivatization assay for formaldehyde determination by HPLC in beer samples, *Food Anal. Methods*, **2015**, 183 (2015).
21. M. K. L. Bicking, W. M. Cooke, F. K. Kawahara, and J. E. Longbottom, Effect of pH on the reaction of 2,4-dinitrophenylhydrazine with formaldehyde and acetaldehyde, *J. Chromatogr.*, **455**, 310 (1988).
22. X. Guan, E. Rubin, H. and Anni, An optimized method for the measurement of acetaldehyde by high-performance liquid chromatography, alcoholism, *Clinical and Experimental Research*, **36**(3), 398 (2012).
23. A. Stafiej, K. Pyrzynska, A. Ranz, and E. Lankmayr, Screening and optimization of derivatization in heating block for the determination of aliphatic aldehydes by HPLC, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **69**(1-2), 15 (2006).
24. Y. L. Lin, P. Y. Wang, L. L. Hsieh, K. H. Ku, Y. T. Yeh, and C. H. Wu, Determination of linear aliphatic aldehydes in heavy metal containing waters by high-performance liquid chromatography using 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatization, *J. Chromatogr. A*, **1216**(36), 6377 (2009).
25. A. Soman, Y. Qiu, and Q. Q. Chan Li, HPLC-UV method development and validation for the determination of low level formaldehyde in a drug substance, *J. Chromatogr. Sci.*, **46**(6), 461 (2008).