

HPLC 를 이용한 화장품 중 살균보존제 다성분 동시분석법 연구

이민정[†] · 김성수 · 이윤정 · 이병철

한국인삼공사 R&D본부

(2022년 10월 14일 접수, 2022년 12월 7일 수정, 2022년 12월 9일 채택)

Analytical Method of Multi-Preservatives in Cosmetics using High Performance Liquid Chromatography

Min-Jeong Lee[†], Seong-Soo Kim, Yun-Jeong Lee, and Byeong-Chul Lee

R&D Headquarters, Korea Ginseng Corporation, 30, Gajeong-ro, Yuseong-gu, Deajeon 34128, Korea

(Received October 14, 2022; Revised December 7, 2022; Accepted December 9, 2022)

요약: 본 연구는 HPLC-PDA를 이용하여 화장품의 보존제 15 종, 자외선 차단제 2종 및 항산화제 1 종에 대해 신뢰성 있는 결과를 확보할 수 있는 최적의 다성분 동시분석법을 구축하고자 하였다. 이동상의 수소이온 농도(pH)가 분석성분의 산해리상수(pKa)에 영향을 주기 때문에 피크의 머무름 시간과 면적값 변화가 생기는 문제를 확인하였고, 이동상 조제시 0.1% H₃PO₄ 첨가량(mL)으로 pH를 조절하는 방법으로써 피크 분리조건을 확립하였다. 시험법의 유효성 검증 결과, 검량선의 직선성(R²)은 0.999 이상을 얻었으며 화장품 2 종(크림, 샴푸)에 대해 정확성은 87.9 ~ 101.1%, 정밀성은 0.1 ~ 7.6%의 결과를 얻었다. 성분별로 검출한계(LOD)는 0.1 ~ 0.2 mg/kg, 정량한계(LOQ)는 2.0 ~ 4.0 mg/kg인 것으로 나타났다. 또한 합성보존제인 methylparaben 과 차이점이 적어 HPLC에서 성분분리가 어려웠던 천연성분인 *p*-anisic acid를 동시에 분리할 수 있었다. 본 연구를 통해 화장품 중 사용상 제한이 필요한 성분들에 대한 품질관리 및 안전성 확보에 효과적으로 활용될 것이다.

Abstract: This study attempted to establish an optimal multi-compound simultaneous analysis method that can secure reliable results for 15 - preservatives, 2 - sun screens and 1 - antioxidants of cosmetics using HPLC-PDA. Since the potential of hydrogen (pH) in the mobile phase affects the acid dissociation constant (pKa) of the preservatives, and the peak retention time shift and area change were observed. The peak separation condition was established by adjusting the pH to 0.1% H₃PO₄ addition (mL) when preparing the mobile phase. As a results of method validation, the linearity correlation coefficient (R²) of above 0.999 were obtained, and accuracy 87.9 ~ 101.1%, 0.1 ~ 7.6% precision for two types of cosmetics (cream and shampoo). It was found that the limit of detection (LOD) was 0.1 ~ 0.2 mg/kg and the limit of quantitation (LOQ) was 2.0 ~ 4.0 mg/kg. In addition, it was possible to simultaneously separate *p*-anisic acid, a natural compound that was difficult to separate in HPLC due to the small difference from methylparaben, a synthetic preservatives. Through this study, it will be effectively used to secure quality control and safety for compound that need restrictions on use cosmetics.

Keywords: *preservatives, pKa, pH, mobile phase, HPLC*

[†] 주 저자 (e-mail: kgcmin@kgc.co.kr)
call: 042-870-3154

1. 서 론

화장품은 피부와 신체의 생리적 기능장애나 구조적 변화를 초래하지 않고 피부의 청결, 아름다움 및 보호를 위해 바르거나 도포하는 물질로 정의되며, 여러 가지 화학물질의 복합체로 그 원료만 해도 수천 가지에 이른다. 이러한 화장품은 의약품과는 다르게 피부에 반복적으로 장기간 사용하는 제품이기 때문에 안전성 확보가 무엇보다 중요하다[1].

국내 유통화장품은 사용할 수 없는 원료(배합금지성분)와 사용상의 제한이 필요한 원료(사용한도성분)를 지정하여 그 외 원료에 대해서는 업체에서 자유롭게 사용할 수 있으며 위해성이 우려되는 경우 위해요소를 평가하여 원료를 지정하여 관리하도록 하고 있다. 한국 식약처(Ministry of Food and Drug Safety)의 「화장품 안전기준 등에 관한 규정(2020)」에 따르면 사용할 수 없는 원료에 대해 잔류농약과 의약품 등을 포함하여 위해성분 약 1,058 성분과, 보존제 59 성분, 자외선차단제 30 성분, 염모제 48 성분 그리고 기타 79 성분 등을 설정하였으며 사용상의 제한이 필요한 원료는 그 사용기준을 지정하고 유통화장품 안전관리 기준에 관한 사항을 정하여 업체가 이를 준수하도록 하고 있다.

살균보존제 성분은 넓은 pH 범위에서 화학적으로 안정적인 특성을 가지며 화장품에 배합하여 미생물 오염과 성장을 방지함으로써 화장품의 유통 및 사용 중 품질유지에 중요한 역할을 한다. 보존제의 종류에 따라 세균이나 진균 억제에 작용하는 효과가 다르고 화장품 제형 특성 때문에 사용가능한 보존제 종류가 달라질 수 있다. Methylparaben 같은 합성보존제는 값이 싸고 광범위한 적용성 등으로 인하여 세균이나 곰팡이, 효모 등의 미생물 증식을 억제하여 제품의 변질과 분해를 방지하기 위한 목적으로 식품, 의약품, 화장품 등에 널리 사용되어 왔다. 그러나 일부 paraben 성분에서 피부흡수를 통해 에스트로젠 유사효과 혹은 접촉성 피부염 등을 일으키는 부작용이 보고되었다[2-3]. 최근에는 화장품 및 기타 살균보존 목적의 생활용품에서 검출되는 몇 가지 보존제 성분이 사회적으로 이슈화되면서 논란이 되기도 하였다.

과거 연구에 의하면 화장품 중 보존제의 정성 및 정량 분석법으로 액체크로마토그래피-자외부흡광검출기(LC-UV)[3-6, 9-17], 기체크로마토그래피-불꽃이온화검출기(GC-FID)[7], 액체크로마토그래피-질량분석기(LC-MS)[8,18]를 이용한 다

성분 동시분석법이 많이 알려져 있다. 그 중 LC-UV 분석법은 화장품 시료를 용매추출 및 여과하여 기기에 바로 적용 가능한 편리성 때문에 식품이나 화장품 보존제 분석에 많이 활용되어 왔다. LC 이동상에 산 또는 염기성 버퍼를 첨가하여 pH를 조절하고 C₁₈ 역상컬럼을 이용하면 15 ~ 30 min 이내에 8 ~ 20 개 안팎의 성분을 대부분 분리할 수 있다. LC-UV 기기분석법은 LC-MS에 비해 화장품 매트릭스에 의한 분석기기의 오염관리가 쉽고, 광다이오드 배열(photodiodearray, PDA) 검출기를 이용하면 소프트웨어를 통해 분석과 동시에 성분마다 다른 최대흡수파장(λ_{max}) 값을 추출할 수 있어 이를 표준액의 흡수파장과 비교함으로써 목적성분을 진위여부를 확인하는데 매우 효과적이다. 그러나 성분들이 LC 이동상의 종류와 pH에 따라 피크 용출시간과 순서, 분리능이 매우 다양하게 변화하므로 이동상 조제와 분석조건을 매번 일정하게 유지하기에 다소 어려운 부분이 있었다[5,11-13].

따라서 본 연구에서는 한국인삼공사 내 화장품 품질관리용 시험법 마련을 위하여 화장품 중 보존제(15 성분), 자외선 차단제(2 성분) 및 향산화제(1 성분) 등 총 18 성분을 선정하였고, HPLC-PDA를 이용하여 일관되고 안정적인 분석결과를 확보할 수 있는 최적의 다성분 동시분석법으로 검토하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 표준액 및 시약

본 실험에 사용된 표준품은 총 20 종으로 그 중 salicylic acid, benzyl alcohol, benzoic acid, sorbic acid, phenoxyethanol, methylparaben, dehydroacetic acid, chlorphenesin, ethylparaben, isopropylparaben, propylparaben, isobutylparaben, butylparaben, benzylparaben, triclosan 등 보존제 15 종과 dioxymethoxybenzene, oxybenzone 등 자외선 차단제 2 종, 3,5-di-*tert*-4-butylhydroxytoluene (BHT) 등 향산화제 1 종, *p*-anisic acid 그리고 내부표준물질(IS)은 acetaminophen을 대상으로 하였다. 표준품은 국내 수입공급업체를 통하여 기기분석용으로 구매하였고, 표준액을 조제하기 전까지 -20 °C 냉동보관하였다. 전처리 및 HPLC 이동상 조제에 acetonitrile (ACN, Merck, Germany), potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄, Sigma-Aldrich, Germany), 85% phosphoric acid (H₃PO₄, Merck, Germany), 18 MΩ 이상의 초순수(D.W., MilliQ Direct8, Merck, Germany)를 사용하였다.

HPLC 분석에 사용한 모든 표준용액은 개별칭량하여 0.1% H₃PO₄가 함유된 90% ACN 용매를 이용해 1,000 mg/L로 조제한 뒤 이를 일정량 혼합해 다성분 분석용 혼합표준용액 20 mg/L를 조제하였다. 동일 용매를 이용하여 단계별로 희석하여 검량선 작성용 혼합표준용액 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1.0 mg/L, 5.0 mg/L, 10.0 mg/L (5단계)를 조제하였으며, 내부표준용액(IS)은 모든 단계에서 20 mg/L가 검출되도록 하였다.

2.2. 시험재료 및 전처리 방법

본 실험에 사용한 화장품 시료(크림, 샴푸)는 한국인삼공사 R&D본부 화장품부서에서 제공받아 사용 전까지 4 °C 냉장보관하면서 분석법 유효성 검증용 시료로 사용하였다. 시료는 50 mL 원심분리용 뚜껑있는 용기에 1.0 g을 칭량하고 내부표준용액을 일정량 첨가하였다. 추출액 0.1% H₃PO₄가 함유된 50% ACN을 20 mL를 넣어 교반기를 이용해 잘 혼합한 뒤 ultrasonic bath (8800, Branson, USA)를 이용해 60 min 추출하였다. 추출액은 3,000 r/min, 10 min 동안 원심분리(Avanti J-15R, Beckman Coulter, USA) 하고 상등액을 뽑아 0.2 µm membrane (PALL, USA)을 이용해 여

Table 1. Retention Time and Maximum Wavelength of 18-Compound

No.	Compound	Retention time (min)	Maximum wavelength (nm)
1	Salicylic acid	6.390	230.3 / 296.5
2	Benzyl alcohol	9.399	206.5
3	Benzoic acid	10.299	227.6
4	Sorbic acid	11.256	260.9
5	Phenoxyethanol	11.575	218.4 / 270.4
6	Methylparaben	12.727	256.2
7	Dehydroacetic acid	13.830	224.3 / 308.4
8	Chlorphenisn	14.286	226.7 / 279.9
9	Ethylparaben	17.951	256.2
10	Isopropylparaben	22.485	256.2
11	Propylparaben	23.036	256.2
12	Isobutylparaben	26.334	256.2
13	Butylparaben	26.587	256.2
14	Benzylparaben	26.850	256.2
15	Dioxybenzone	27.618	284.4
16	Oxybenzone	31.457	286.8 / 240.6
17	Triclosan	33.306	281.1
18	BHT	36.566	277.5

과하고 이를 HPLC 기기분석용 시료로 사용하였다[5,6].

2.3. 기기분석 조건

분석장비는 HPLC Alliance 2695 System (Waters, USA)와 PDA 2995 (Waters, USA) 검출기를 사용하였고 컬럼은 Zorbax XDB C₁₈, 2.0 × 250 mm, 5 µm (Agilent, USA)를 장착하였다. 기기분석 및 정성, 정량에 Empower 2 (Waters, USA) 운영 소프트웨어를 사용하였다. 이동상 A는 0.7% KH₂PO₄, 500 mL 조제 후 0.1% H₃PO₄, 20 mL를 첨가하였고(pH 4.01), 이동상 B는 90% ACN, 500 mL에 0.1% H₃PO₄, 10 mL를 첨가하여 준비하였다. 이동상의 pH는 pH meter (Mettler Toledo, Germany)를 이용해 pH 표준용액을 이용하여 검량선 작성 후 측정하였다. PDA를 이용해 모든 성분의 최대 UV흡수파장값을 우선 확인한 뒤(Table 1) 성분별 감도가 골고루 유지되는 범위를 선택하였다. UV 검출조건은 UV 220 nm에서 측정하되 동시에 PDA 200 ~ 400 nm 스캔 측정값을 얻을 수 있게 설정하여 시료 중 보존제 검출 시 고유의 스펙트럼을 통해 성분확인 정확도를 높일 수

Table 2. HPLC Conditions for Analysis

Instrument	HPLC Alliance 2695 system (Waters, USA)		
Detector	PDA 2995 (PDA 200 - 400 nm, UV 220 nm)		
Column	Zorbax XDB C ₁₈ , 2.0 × 250 mm, 5 µm (Agilent, USA)		
Column temperature	40 °C		
Flow rate	0.6 mL/min		
Injection volume	3 µL		
Mobile phase A	0.7% KH ₂ PO ₄ , 500 mL + 0.1% H ₃ PO ₄ , 20 mL (pH 4.01)		
Mobile phase B	90% ACN, 500 mL + 0.1% H ₃ PO ₄ , 10 mL		
	Time (min)	%A (D.W.)	%B (ACN)
	0.00	90	10
	0.50	90	10
	8.00	72	28
	12.00	70	30
Gradient condition	18.00	60	40
	27.00	35	65
	32.00	0	100
	38.00	0	100
	38.01	90	10
	42.00	90	10

있도록 하였다. 상세한 기기분석 조건은 Table 2와 같다.

2.4. 시험법 검토

2.4.1. 이동상 최적조건 설정

예비실험을 통하여 일부 보존제 성분이 HPLC 이동상의 pH조건에 따라 피크 이동, 분리능 악화, 피크면적 변화 등으로 인해 시험법의 신뢰성을 떨어뜨리는 단점이 있음이 확인되었다. 이동상 조제시 반복되는 이러한 문제를 해결하기 위하여 이동상의 pH를 안정적으로 유지할 수 있는 조제방법이 요구되었다. 먼저 이동상 B (0.1% H₃PO₄, 10 mL가 첨가된 90% ACN, 500 mL)는 고정된 뒤 이동상 A의 조성을 변화시켰다. 0.7% KH₂PO₄ 500mL로 만든 이동상 A에 0.1% H₃PO₄ 용액을 0, 5, 20, 30 mL 단계별로 첨가하여 pH를 측정하고 그에 따른 기기분석을 수행하여 최적의 이동상 조건을 검토하였다[5].

2.4.2. 유효성 확인

시험법의 유효성 확인은 목적성분의 특이성(specificity)과 직선성(linearity), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 검출한계(detection limit, LOD), 정량한계(quantitation limit, LOQ) 등의 항목을 검토하였다. 보존제, 자외선 차단제 및 향산화제 등 18종에 대한 검량선용 혼합표준액은 농도별 5 단계로 조제하여 기기분석 후 내부표준물질 정량법을 적용하였다. 모든 성분에 대해 직선성 상관관계수 0.99 이상을 확인하였고, 검출한계는 신호대 잡음비(S/N ratio) 3, 정량한계는 10을 기준하였고 시료에서는 정량한계에 전처리 희석배수(본 연구에서는 20 배)를 적용하였다. 목적성분은

함유하지 않은 무첨가 시료를 준비하여 최종농도 5.0 mg/kg, 10.0 mg/kg (2수준)을 되도록 혼합표준용액을 첨가하여 회수율시험을 실시하였다. 각 시료는 시험 전 내부표준용액(IS)이 최종 20 mg/kg가 되도록 첨가한 후 수준별로 3반복 처리하여 제시된 전처리 및 기기분석을 수행하였다.

2.4.3. Methylparaben과 *p*-Anisic acid의 피크분리

천연성분으로서 방부효과를 갖는 것으로 보고된 *p*-anisic acid를 개발된 기기분석법을 통해 methylparaben을 포함한 타성분과의 동시분석 가능성을 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 성분 분리조건의 최적화

식약처에서 발간한 「화장품 중 사용도성분 분석법 가이드라인(2019)」에 기재된 살균보존제 동시분석법에 따르면 1% H₃PO₄를 함유한 수용액과 ACN을 이용하여 13종의 살균보존제를 37 min 동안 용출하였다. 다른 연구 사례를 보면 13종의 살균보존제와 자외선차단성분 17종을 다 성분 동시분석 또는 그룹별로 나누어 전처리 하는 등의 시험법을 보고하고 있다[16]. 그러나 연구자에 따라 사용되는 살균보존제 성분, 컬럼의 선택, 이동상 조성, 분석기기에 따라 피크분리에 큰 편차를 보이며 이는 시험법의 선택성과 실험간 재현성을 저해하는 요소로 작용하였다. 이러한 과거 연구사례와 예비실험을 통하여 먼저 살균보존제 분석을 위한 컬럼 1종을 선택하였으며 이동상의 수소이온농도(pH)와 성분의 산의 해리상수(pKa) 관계가 피크분리

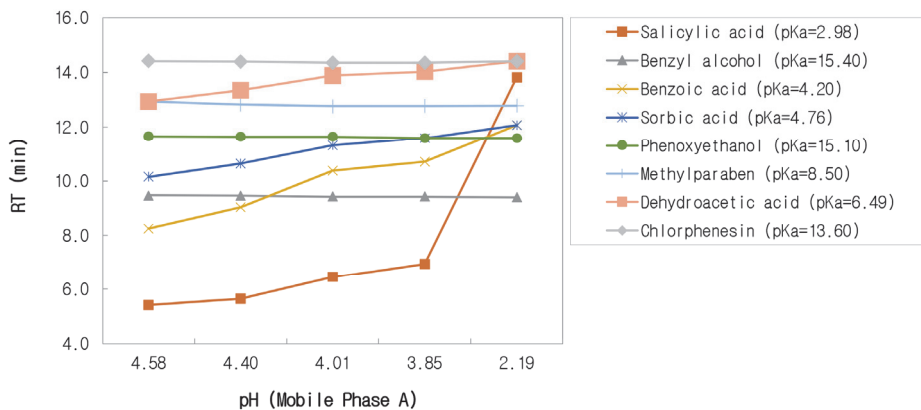


Figure 1. Variation of the retention time of preservatives peak according to pH change of mobile phase A which was added stepwise with 0.1% H₃PO₄ in 0.7% KH₂PO₄ solution. (The sources of pKa are PubChem and Chemaxon).

에 영향을 주는 주요 인자로 판단하고 실제 실험을 통하여 분석조건을 설정하였다.

먼저 이동상 B는 90% ACN (500 mL)에 0.1% H₃PO₄ 첨가량을 10 mL로 고정하였고, 이동상 A는 0.7% KH₂PO₄/DW (500 mL)에 0.1% H₃PO₄ 를 0, 5, 20, 30 mL를 단계별로 첨가한 것, 그리고 0.1% H₃PO₄ 용액, 500 mL를 조제하였다. 각 이동상은 pH를 측정하고 뒤 동일한 조건으로 HPLC/UV 분석하였다. 이동상의 A의 pH를 4.58에서 2.19까지 5 단계 변화시켜 혼합표준용액(10 mg/L)을 분석한 결과 낮은 pKa를 갖는 4 성분에서 머무름 시간 변화(retention time shift)가 나타났다. 머무름 시간이 변화된 피크는 PDA의 스캔기능을 이용해 고유의 스펙트럼을 서로 비교하며 추적하였다(Figure 1). 머무름 시간 변화가 나타난 4 성분(괄호안은 pKa)은 salicylic acid (2.98), benzoic acid (4.20), sorbic acid (4.76), dehydroacetic acid (6.49) 순이었으며 변화

가 없는 4 성분은 benzyl alcohol (15.40) methylparaben (8.50), phenoxyethanol (15.10), chlorphenesin (13.60) 로 나타났다(Figure 2). 기존 연구에 따르면 이동상 pH가 산해리상수(pKa)를 변화시킬 수 있고 정지상과 이동상에서의 산의 분포에 영향을 미쳐 분석성분의 머무름과 분리에 영향을 준 것이라고 보고하고 있다[4,5,11-13].

또한 낮은 pH에서 benzyl alcohol, benzoic acid, salicylic acid, sorbic acid의 피크겹침이 나타났으며, pH5, 6, 7에서 분석을 수행하였을때 2-methyl isothiazol-3(2H)-one, 2-chloro-2-methyl-4-isothiazoin-3-one, benzyl alcohol, salicylic acid 에서 심각한 피크 끌림이 관찰되었다고 하였다. 0.05 mol/L ammonium acetate 용액(pH = 4.5)을 사용한 이동상 조건에서는 피크끌림과 피크겹침없이 성공적으로 분리하였다고 보고하였다[11]. 그러나 이동상의 pH가 paraben 6종의 머무름시간에는 영향을 주지 못했다고 보고하였는데 이는 본

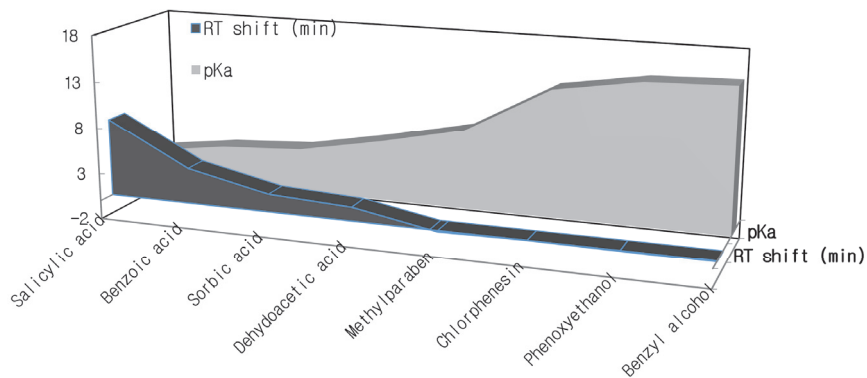


Figure 2. Influence of the pKa of preservatives on the peak retention time shift (min).

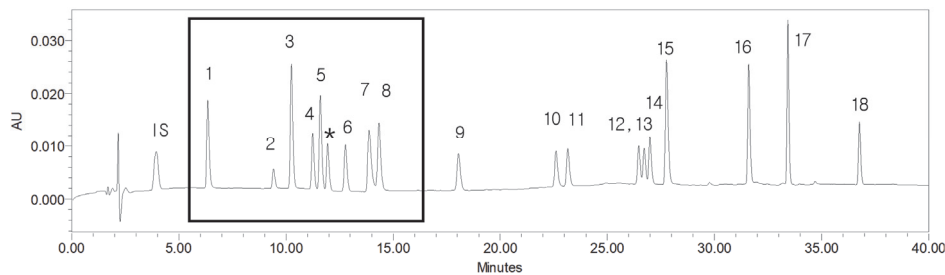


Figure 3. HPLC chromatogram of 18-compound standard solution (10 mg/L in 90% ACN with 0.1% H₃PO₄) by UV absorption in 220 nm. (See Table 1.) The resolution of peaks in the square box is changed according to pH of LC mobile phase. IS; acetaminophen; 1. salicylic acid; 2. benzyl alcohol; 3. benzoic acid; 4. sorbic acid; 5. phenoxyethanol; *. *p*-anisic acid; 6. methylparaben; 7. dehydroacetic acid; 8. chlorphenesin; 9. ethylparaben; 10. isopropylparaben; 11. propylparaben; 12. isobutylparaben; 13. butylparaben; 14. benzylparaben; 15. dioxymetazone; 16. oxybenzone; 17. triclosan; 18. BHT.

Table 3. Precision of Peak Retention Time and Area in 18-Compound Standard Solution (10 mg/L) Analysis during 2020 - 2022

Compound	Peak retention time (min, N = 5)		Peak area (STD 10 mg/L, N = 5)	
	Mean	%RSD	Mean	%RSD
Salicylic acid	6.390	1.4	137,751	5.1
Benzyl alcohol	9.399	0.8	34,415	9.4
Benzoic acid	10.299	1.2	195,734	5.6
Sorbic acid	11.256	1.0	94,873	10.3
Phenoxyethanol	11.575	0.8	154,915	4.8
Methylparaben	12.727	0.9	88,751	7.5
Dehydroacetic acid	13.830	1.1	173,704	8.9
Chlorphenisin	14.286	1.2	135,051	6.1
Ethylparaben	17.951	1.0	80,010	6.3
Isopropylparaben	22.485	0.9	70,506	7.2
Propylparaben	23.036	0.8	71,015	5.9
Isobutylparaben	26.334	0.7	64,843	5.8
Butylparaben	26.587	0.7	62,569	5.9
Benzylparaben	26.850	0.7	84,731	8.4
Dioxybenzone	27.618	0.7	229,265	6.6
Oxybenzone	31.457	0.5	177,477	5.1
Triclosan	33.306	0.4	205,191	6.1
BHT	36.566	0.5	90,674	5.8

연구에서도 7종의 파라벤에 대해 동일한 결과를 얻었으며 그 외 triclosan, dioxibenzone, oxybenzone, BHT 피크의 머무름시간도 별 영향이 없는 것으로 확인되었다[11].

보존제 분석시 사용된 이동상 buffer의 종류는 주로 phosphoric acid[4-6,10,12, 13,16], formic acid[14,15,17,18], acetic acid[9,11,12], 등이 있으며 ammonium acetate[11,13,18]와 potassium dihydrogen phosphate[5], ammonium formate[13] 등이 있는 것으로 보고된다. HPLC를 이용한 일반적인 보존제 다성분 분석에서 연구자와 목적성분에 따라 다소 차이가 있지만 이동상의 pH는 약 2.5 ~ 4.5 수준으로 알려져 있다. 본 연구에서는 보존제 8 성분에서 양호한 분리를 나타내는 이동상의 조건(pH = 4.01)을 확인하였고 이때 첨가된 0.1% H₃PO₄의 부피를 파악하여 분석법으로 확립하였다. 이 방법은 이동상 조제에 상관없이 피크 머무름 시간을 일정하게 유지할 수 있었으며 사용컬럼의 종류와 분석장비에 따라 나타날 수 있는 분석환경 변화에 효과적으로 대응할 수 있는 방법으로 판단된다.

이같은 이동상 조제방법으로 2020년부터 2022년까지 분석된 5건(동일장비 및 컬럼 사용)의 표준용액 데이터를 비교하여 성분별 피크의 머무름 시간과 면적을 조사한 결

과, 머무름시간 (min)이 0.4 ~ 1.4 % RSD, 피크면적(area)은 4.8 ~ 10.3 % RSD 수준을 나타내어 일관성 있는 정밀한 분석조건으로 개발되었음을 확인할 수 있었다(Table 3).

3.2. 시험법의 유효성 검증

시험법의 유효성 검증은 식약처의 「의약품등 분석법의 밸리데이션 가이드라인」을 따랐다. 0.2 mg/L ~ 10.0 mg/L의 검량선 작성용 혼합표준용액을 5 단계로 조제하여 기 분석한 결과 상관계수 R² = 0.999 이상의 양호한 직선성을 확인하였다. 표준용액을 3 반복 분석하여 S/N ratio = 3을 검출한계(LOD), S/N ratio = 10을 정량한계(LOQ)로 구하고 이에 희석배수 20 배를 적용하여 시험법 정량한계를 계산하였다. 그 결과 성분별 검출한계는 0.1 ~ 0.2 mg/kg, 정량한계는 2.0 ~ 4.0 mg/kg 으로 확인되었다(Table 4).

크림과 샴푸에 혼합표준용액을 각 2 수준으로 첨가하고 3 반복 실험한 결과, 회수율은 크림 89.8 ~ 98.6%, 샴푸는 87.6 ~ 101.1%로 식약처 가이드라인 80 ~ 120% 이내의 양호한 결과를 얻었다. 상대표준편차(% RSD)는 크림 0.1 ~ 3.9%, 샴푸 0.2 ~ 7.6%으로 10% 이내의 정밀성을 나타냈다(Table 5).

Table 4. Linear Regression, Correlation Coefficient, LOD, LOQ for 18-Compound

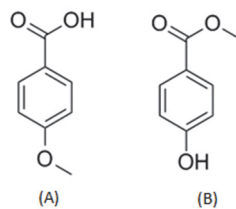
Compound	Regression equation	Correlation coefficient (R^2)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)
Salicylic acid	$Y = 13600X - 293$	0.9999	0.1	2.0
Benzyl alcohol	$Y = 1580X + 339$	0.9998	0.2	4.0
Benzoic acid	$Y = 18900X + 465$	0.9999	0.1	2.0
Sorbic acid	$Y = 9720X + 609$	0.9999	0.1	2.0
Phenoxyethanol	$Y = 15000X - 153$	0.9999	0.1	2.0
Methylparaben	$Y = 9170X - 238$	0.9999	0.2	4.0
Dehydroacetic acid	$Y = 18200X - 1380$	0.9999	0.2	4.0
Chlorphenislin	$Y = 10800X - 787$	0.9999	0.2	4.0
Ethylparaben	$Y = 8170X - 306$	0.9999	0.2	4.0
Isopropylparaben	$Y = 7220X - 7.6$	0.9999	0.2	4.0
Propylparaben	$Y = 7170X - 9.2$	0.9999	0.2	4.0
Isobutylparaben	$Y = 6640X - 445$	0.9999	0.2	4.0
Butylparaben	$Y = 6460X - 454$	0.9999	0.2	4.0
Benzylparaben	$Y = 8220X - 1090$	0.9999	0.1	2.0
Dioxybenzone	$Y = 22900X + 113$	0.9999	0.1	2.0
Oxybenzone	$Y = 17500X - 129$	0.9999	0.1	2.0
Triclosan	$Y = 2050X + 4440$	0.9999	0.1	2.0
BHT	$Y = 9120X - 684$	0.9999	0.2	4.0

Table 5. Accuracy and Precision Results for 18 Compounds in Cream and Shampoo

No	Compounds	Added STD (mg/kg)	Cream (N = 3)		Shampoo (N = 3)	
			Recovery (%)	(%)RSD	Recovery (%)	(%)RSD
1	Salicylic acid	5.0	93.6	0.5	93.3	1.2
		10.0	92.8	1.2	93.5	1.0
2	Benzyl alcohol	5.0	89.8	3.9	95.7	5.5
		10.0	96.0	2.7	94.1	3.7
3	Benzoic acid	5.0	94.6	0.5	96.3	5.2
		10.0	92.9	0.8	94.3	3.5
4	Sorbic acid	5.0	94.6	0.8	94.2	1.2
		10.0	92.9	0.7	93.9	1.1
5	Phenoxyethanol	5.0	95.6	0.9	94.1	0.7
		10.0	93.4	0.6	94.3	1.0
6	Methylparaben	5.0	98.6	0.4	93.6	3.2
		10.0	95.5	0.2	95.3	3.5
7	Dehydroacetic acid	5.0	92.7	0.4	87.9	6.9
		10.0	91.9	0.9	93.6	1.4
8	Chlorphenislin	6.0	95.1	1.3	101.1	2.7
		12.0	92.9	0.7	98.6	1.2
9	Ethylparaben	5.0	94.3	0.7	92.7	0.8
		10.0	92.7	1.1	93.6	1.8

Table 5. (Continued)

No	Compounds	Added STD (mg/kg)	Cream (N = 3)		Shampoo (N = 3)	
			Recovery (%)	(%)RSD	Recovery (%)	(%)RSD
10	Isopropylparaben	5.0	96.1	0.3	94.5	0.9
		10.0	92.6	1.4	94.4	1.8
11	Propylparaben	5.0	97.0	0.2	97.8	0.2
		10.0	93.1	1.2	95.4	1.1
12	Isobutylparaben	5.0	92.9	0.3	91.4	3.0
		10.0	92.3	1.2	93.2	1.0
13	Butylparaben	5.0	92.5	0.5	88.7	5.7
		10.0	91.9	0.5	93.4	0.3
14	Benzylparaben	5.0	94.5	0.6	87.6	7.6
		10.0	93.3	1.0	93.7	0.3
15	Dioxybenzone	5.0	93.2	0.3	89.4	0.8
		10.0	92.3	0.4	92.3	0.3
16	Oxybenzone	5.0	90.1	0.1	95.0	4.3
		10.0	90.8	1.0	93.4	1.2
17	Triclosan	5.0	92.8	0.2	100.4	0.5
		10.0	92.8	0.8	98.6	1.2
18	BHT	5.0	90.5	1.0	94.4	4.2
		10.0	90.7	1.0	93.0	4.2

Figure 4. Chemical structure of *p*-anisic acid (A) and methylparaben (B).

3.3. *p*-Anisic acid 의 분리 및 검출

천연추출성분인 *p*-anisic acid는 방부효능을 갖으며 methylparaben과 같은 분자량 (152.15 g/mol), 비슷한 구조, 같은 최대흡수파장(250 nm)를 보이기 때문에 일반적인 화장품 분석에 사용되는 HPLC를 통해서 두 성분을 분리하기가 쉽지 않다고 하였다(Figure 4)[17].

이에 개발된 기기분석법을 적용시켜 *p*-anisic acid와 methylparaben의 표준용액으로 각 성분의 머무름 시간과 고유 PDA 스펙트럼을 비교 분석하였다. 18 성분의 혼합표준용액에 *p*-anisic acid 표준용액을 첨가하여 19 종을 동시에 분석한 결과, *p*-anisic acid와 methylparaben 피크의 머무름 시간이 순서대로 11.945 min, 12.774 min에서 용출되었고

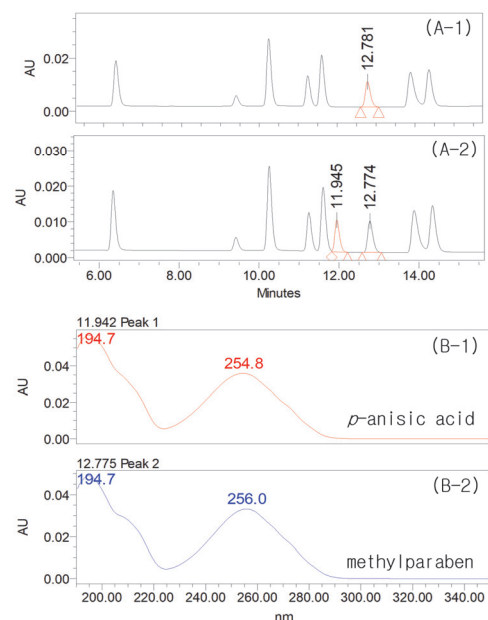


Figure 5. Comparison of the chromatogram of 18-standard solution (A-1) and added *p*-anisic acid standard solution (A-2) with 10 mg/L concentration. PDA spectrum of *p*-anisic acid (B-1) and methylparaben (B-2) from chromatogram (A-2).

이들의 최대 흡수파장값이 각각 254.8 nm 과 256.0 nm 로 나타나 비슷한 파장의 두 성분이 타 보존제 성분과도 잘 분리되는 것을 확인할 수 있었다(Figure 5).

4. 결 론

본 연구는 HPLC를 이용하여 화장품 중 살균보존제 16 종과 자외선차단제 2 종, 향산화제 1 종에 대한 다성분 분석법을 개발하고 유효성 검증을 실시하고자 하였다. 보존제 다성분 분석에서 흔히 나타나는 피크분리 문제가 분석 조건의 견고성과 분석결과의 신뢰성을 떨어뜨리는 요인으로 판단하고 이에 이동상 조제를 정밀하게 수행하여 시험 환경 변화에 효과적으로 대응가능한 분석방법을 찾고자 하였다. 그 결과 성분의 pKa와 이동상 pH 범위가 비슷한 보존제 성분 4 종(salicylic acid, benzoic acid, sorbic acid, dehydroacetic acid)이 실제 분석에서도 머무름시간이 크게 이동하는 현상을 확인하였다. 이에 따라 0.1 % H₃PO₄의 첨가량(mL)을 변화시켜 이동상의 pH를 정밀하게 조절하였고 성분피크의 머무름시간과 면적값이 일관된 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 또한 합성보존제인 methylparaben과 차이점이 적어 성분분리가 어려웠던 천연성분인 *p*-anisic acid를 효과적으로 동시분리할 수 있었다. 개발된 분석법을 적용하여 검량선 직선성은 모두 0.999 이상의 상관계수를 얻었고 화장품 2 종 (크림, 샴푸)에 5 mg/kg, 10 mg/kg 수준의 표준액을 첨가하여 회수율 시험한 결과 식약처 가이드라인에 적합한 정확성 87.9 ~ 101.1 % 이내, 정밀성 0.1 ~ 7.6 % 이내의 양호한 결과를 얻었다.

신뢰성 있는 시험결과를 얻기 위해서는 연구실마다 다른 분석기기, 컬럼, 시험자 또는 이동상 조제시마다 생기는 편차를 줄여 일관된 분석조건을 유지하는 것이 중요하다. HPLC를 이용한 살균보존제 분석에서 나타나는 이러한 현상을 실험적으로 증명하였으며 문제를 효과적으로 해결할 수 있는 방안을 제시하였다. 본 연구를 통해 화장품 중 사용상의 제한이 필요한 성분들에 대한 화장품 품질관리 및 안전성 확보에 유용하게 활용될 것으로 판단된다.

References

1. K. H. Lee, Master's Thesis Dissertation, Chung-Ang Univ., Seoul, Korea (2010).
2. E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (Parabens) are estrogenic, *Toxicology and Applied Pharmacology*, **153**(1), 12 (1998).
3. G. A. Shabir, Determination of combined *p*-hydroxy benzoic acid preservatives in a liquid pharmaceutical formulation by HPLC, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**(1), 207 (2004).
4. J. E. Park, S. M. Lee, H. J. Jeong, and I. S. Chang, Simultaneous determination of 8 preservatives (6 parabens, 2-phenoxyethanol and chlorphenesin) in cosmetics by UPLCTM, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **33**(4), 263 (2007).
5. J. S. Jeon, H. T. Kim, M. G. Kim, M. S. Oh, S. R. Hong, M. H. Yoon, S. M. Cho, H. C. Shin, J. H. Shim, A. Ramadan, and A. M. Abd El-Aty, Simultaneous determination of water-soluble whitening ingredients and adenosine in different cosmetic formulations by high-performance liquid chromatography coupled with photodiode array detection, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **38**(3), 286 (2016).
6. J. L. Oliveira Arlas, C. B. Rocha, A. L. Q. Silva Santos, L. C. Marube, L. Kupski, S. S. Caldas, and E. G. Primel, Fast and simple method of simultaneous preservatives determination in different processed foods by QuEChERS and HPLC-UV : Method development, survey and estimate of daily intake, *Food Chemistry*, **293**, 112 (2019).
7. S. H. Cho, H. R. Jung, Y. S. Kim, Y. H. Kim, E. M. Park, S. W. Shin, K. S. Eum, S. R. Hong, H. J. Kang, and M. H. Yoon, Simultaneous multicomponent analysis of preservatives in cosmetics by gas chromatography, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **45**(1), 69 (2019).
8. 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. A*, **1120**(1-2), 244 (2006).
9. M. Akkbiq, Z. B. Assim, and F. B. Ahmad, Optimization and validation of RP-HPLC-UV/Vis method for determination phenolic compounds in several personal care products, *Int. J. Anal. Chem.*, **2011**, 858153, <https://doi.org/10.1155/2011/858153> (2011).
10. S. J. Jung, Y. S. Hwang, C. M. Choi, A. S. Park, S. U. Kim, H. J. Kim, J. H. Kim, and K. Jung, Examination

- and quantification of preservatives in cosmetics for children, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **41**(3), 219 (2015).
11. N. R. Cha, J. K. Lee, H. J. Jeong, J. C. Cho, M. J. Kim, and S. Y. Lee, Determination of 19 preservatives in various matrices by high-performance liquid chromatography, *Analytical Letters*, **45**(15), 2148 (2012).
 12. R. Kaliszam, P. Wiczling, and J. Markuszewski, pH gradient high-performance liquid chromatography: theory and applications, *J. Chromatogr. A*, **1060**(1-2), 165 (2004).
 13. W. Gao and C. Legido-Quigley, Fast and sensitive high performance liquid chromatography analysis of cosmetic creams for hydroquinone, phenol and six preservatives, *J. Chromatogr. A*, **1218**(28), 4307 (2011).
 14. T. Wu, C. Wang, X. Wang, and Q. Ma, Simultaneous determination of 21 preservatives in cosmetics by ultra performance liquid chromatography, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **30**(5), 367 (2008).
 15. I. Baranowska and I. Wojciechowska, The determination of preservatives in cosmetics and environmental waters by HPLC, *Pol. J. Environ. Stud.* **22**(6), 1609 (2013).
 16. A. Kim, Y. J. Lee, Y. S. Cho, H. J. Kim, S. H. Cho, Y. H. Kim, J. W. Ro, and Y. B. Park, A study on filters, preservatives and heavy metals contained in the children's and inorganic sunscreens distributed in Korea, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **47**(4), 289 (2021).
 17. I. H. Kim, D. H. Ryu, Y. S. Kim, E. S. Jung, and D. H. Park, Determination of *p*-anisic acid and methylparaben by using high performance liquid chromatography, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **40**(4), 359 (2014).
 18. G. Alvarez-Rivera, T. Dagnac, M. Lores, G. Garcia-Jares, L. Sanchez-Prado, J. Pablo Lamas, and M. Llompert, Determination of isothiazolinone preservatives in cosmetics and household products by matrix solid-phase dispersion followed by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1270**, 41 (2012).