

화장품중 살균·보존제의 동시분리 및 정량

양성준[#] · 김영옥 · 손경훈 · 이정표 · 정래석 · 양원준 · 백옥진 · 이현경* · 최상숙

식품의약품안전청 의약품평가부 의약외품과,*상명대학교 공업화학과

(Received January 28, 2002; Revised June 25, 2002)

Simultaneous HPLC Determination of Preservatives in Cosmetics

Seong Jun Yang[#], Young Ok Kim, Kyung Hun Son, Rae Sok Jung, Won Jun Yang,
Ock Jin Paek, Hyun-Kyung Lee* and Sang Sook Choi

Quasi drugs & Cosmetics Division, Department of Drug Evaluation, Korea Food and Drug Administration,
5 Nokbun-Dong, Eunpyung-Ku, Seoul 122-704, Korea

*College of Nature Sciences, Sang-Myung University, Seoul, Korea

Abstract — A high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous quantitative analysis of methylparaben (MP), ethylparaben (EP), propylparaben (PP), butylparaben (BP) and imidazolidinyl urea(IU) or diazolidinyl urea(DU) in cosmetics was studied by using a cyano-propyl column and 0.05M hexanesulfonic acid at 228 nm. Calibration curves were found to be linear in the 60-1000 $\mu\text{g/mL}$ range (parabens), 100-1,250 $\mu\text{g/mL}$ range (IU) and the 120-2000 $\mu\text{g/mL}$ range (DU). Linear regression analysis of the data demonstrates the efficacy of the method in terms of precision and accuracy. An extraction method is developed and validated in order to apply this chromatographic method to a commercial cosmetic cream. The precision of this method, calculated as the relative standard deviation (RSD) of the recoveries (0.46-2.71%) was excellent for all compounds.

Keywords □ Imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, paraben, HPLC, cosmetics

이키다졸리디닐우레아(IU), 디아졸리디닐우레아(DU) 및 파라벤류는 화장품 및 의약품에서 살균·보존제로 널리 사용되어 왔다¹⁻³⁾ 특히, IU 또는 DU와 파라벤류의 혼합 사용은 박테리아, 효모, 곰팡이 등에 대한 살균 작용을 서로 상승시키는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 그러나, 세포 독성 및 접촉성 알레르기 등 안전성에 문제를 내포하고 있어, 이들 성분들에 대해서는 식품의약품안전청 고시로 화장품에서 그 배합한도를 IU 0.6%, DU 0.3%, 파라벤류 단일성분 1%(벤질에스테르 0.1%) 혼합사용시 4%로 규정을 하여 관리하고 있다.⁵⁻⁶⁾ 그러므로, 이들 살균·보존제의 분석은 품질관리 측면에서 뿐만 아니라 안전성 면에서도 매우 중요하다. 지금까지 이들 개개 살균·보존제 분석법은 보고된 바 있으나 IU 또는 DU와 파라벤류의 동시분석법은 보고된 바 없어 본 연구에서는 기초 화장품중에 들어 있는 IU와 파라벤류 또는 DU와 파라벤류를 액체크로마토그래프법을 이용하여 동시에 분리 정량 방법을 연구하여 양호한 결과를 얻었기에

이에 보고하고자 한다.

실험방법

실험재료 및 기기

Imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben 표준품 및 caffeine은 Sigma-Aldrich사(Pennsylvania, USA)에서 구입하여 사용하였고, imidazolidinyl urea와 diazolidinyl urea의 구조식은 Fig. 1과 같다. 용매로 methanol(JT, Baker) 및 3차 증류수(18 $\mu\Omega$ Barnstead, USA)를 사용하였고, 분석기기로서 high performance liquid chromatography(HPLC) (Waters, USA)를 사용하였다. 시험에 사용한 검체는 시판 화장품 17종을 사용하였으며, 동 제품들의 살균·보존제의 함유량은 Table I과 같았다. 또 Table II의 표준처방설계에 따라 만든 화장품 2종을 검체로 사용하였다.

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-380-1721 (팩스) 02-380-1723

표준액의 제조

Imidazolidinyl urea와 parabens - 각각의 표준품을 IU 250

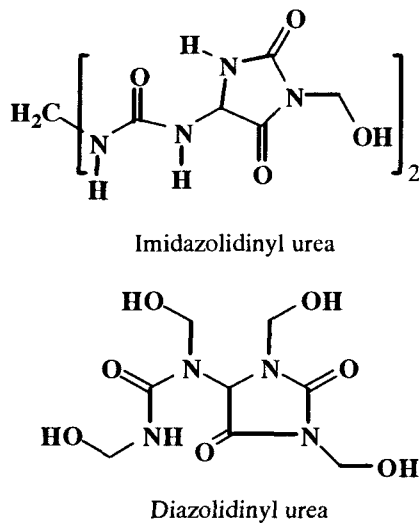


Fig. 1 - Structure of imidazolidinyl urea and diazolidinyl urea.

mg, MP, EP, PP 및 BP는 각각 200 mg씩을 정밀하게 달아 용매A(내부표준액)를 넣어 녹여 각각 100 mL로 하여 표준원액으로 하였다(2500 µg/mL, 2000 µg/mL). 표준원액 0.8 mL, 1.2 mL, 1.6 mL, 2.5 mL, 5.0 mL, 10.0 mL을 취하여 용매A를 넣어 20 mL로 한 액을 IU 표준액으로 하고, 표준원액 0.6 mL, 1.2 mL, 2.5 mL, 5.0 mL, 10.0 mL을 취하여 넣어 20 mL로 한 액을 파라벤류 표준액으로 하였다(IU : 100~1250 µg/mL, 파라벤류 : 60~1000 µg/mL).

Diazolidinyl urea와 parabens - 각각의 표준품을 DU 400 mg, MP, EP, PP 및 BP는 각각 200 mg씩을 정밀하게 달아 용매A(내부표준액)를 넣어 녹여 각각 100 mL로 하여 표준원액으로 하였다(4000 µg/mL, 2000 µg/mL). 표준원액 0.6 mL, 1.2 mL, 2.5 mL, 5.0 mL, 10.0 mL을 취하여 용매A를 넣어 20 mL로 한 액을 표준액으로 하였다(DU : 120 µg/mL~2000 µg/mL, 파라벤류 : 60 µg/mL~1000 µg/mL).

검액의 조제

시판 화장품 17종을 검체로 하여 각각 4 g을 정밀하게 달아

Table II - Formulas of simulated products (content : w/w%)

Components	1	2
Polysorbate 60	1.20	1.20
Sorbitan Sesquistearate	0.4	0.4
Mineral Oil	15.0	-
Cetyl Octanoate	-	15.0
Cyclomethicone	5.0	5.0
EDTA Disodium	0.5	-
Glycerin	5.0	5.0
Butylene Glycol	-	5.0
Polyacrylamide/C13-14 Isoparaffin/Laureth-7	0.5	1.0
Perfume	0.2	0.2
Purified Water	To 100	

내부표준액을 넣어 20 mL로 하고 초음파 진탕하여 검체를 충분히 분산시켜 추출한 다음 30분간 원심분리(3500 rpm)한 후 상등액을 취하여 검액으로 하였다.

내부표준액 조제(용매A)

Caffeine 250 mg을 정밀하게 달아 50% methanol에 넣어 녹여 200 mL로 하고, 이 액 40 mL을 정확하게 취하여 50% methanol을 넣어 400 mL로 하여 내부표준액(용매A)로 하였다.

회수율 시험

Table II의 표준처방설계에 따라 만든 화장품 2종을 검체로 하여 0.5 g씩 정밀하게 달아 내부표준액(용매A) 50 mL을 넣어 30분간 초음파 진탕하고 30분간 원심분리(3,500 rpm)한 후 상등액을 취해 여과한다. 이 액을 가지고 Table III의 기기조건에 따라 5회 시험하여 그 평균 및 상대표준편차를 구하였다.

Table III - Analytical condition of HPLC

Column	Cyanopropyl column (5 µm, 4.6 mm × 150 mm)
Mobile Phase	50% methanol with 0.5 mM hexanesulfonic acid
Detector	UV/Visible absorbance detector
Wavelength	228 nm
Flow Rate	1.3 mL/min
Injection volume	10 µL

Table I - Formulas of commercial products (unit: g)

No	Sample																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Components																	
IU	-	-	0.2	0.4	0.2	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1
MP	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.05	0.2	0.3	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3
EP	0.1	-	-	0.1	0.1	0.3	-	0.05	-	-	0.05	-	-	-	0.02	-	-
PP	-	-	0.05	-	-	0.1	-	0.1	-	0.05	0.05	-	-	-	-	-	0.05
BP	-	-	-	-	-	-	-	0.05	-	-	-	-	-	0.2	-	-	0.1

*IU : imidazolidinyl urea, DU : diazolidinyl urea, MP : methyl paraben, EP : ethyl paraben, PP : propyl paraben, BP : butyl paraben

조작

표준액과 검액을 가지고 다음 Table III의 조작조건으로 약전 일반시험법의 액체크로마토그래프법에 따라 시험하였다.

실험결과 및 고찰

검액조제의 검토

표준처방설계에 따라 만든 화장품 2종(Table II)을 검체로 하여 0.5 g씩 정밀하게 달아 50%, 100% methanol 및 100% acetonitrile의 내부표준액 50 mL를 넣어 30분간 초음파 진탕하고 3)분간 원심분리(3,500 rpm)하여 상등액을 취해 여과한 액과 이들 내부표준액을 용매로 사용한 검액들을 30분간 초음파 분산시킨 다음 규조토 약 2 g과 혼합하여 -70°C에서 6시간동안 가끔씩 교여주면서 방치한 후, 상등액을 무수황산나트륨으로 탈수 여과한 액을 가지고 Table III의 기기 조건으로 비교 실험하였을 때, 50% methanol의 내부표준액을 용매로 하여 30분간 초음파 진탕하고 30분간 원심분리(3,500 rpm)하여 상등액을 취해 여과한 액을 가지고 실험한 경우가 가장 양호한 결과를 나타냈다. 100% methanol과 acetonitrile의 경우, 살균·보존제뿐만 아니라 다른 성분들의 추출도 동시에 이뤄져 분리도가 양호하지 못하였으며, 초음파 조작 및 규조토 첨가 후 탈수 조작 행한 경우는 상대적으로 여러 조작 과정을 거침으로, 살균·보존제의 손실이 비교적 많이 발생한 것으로 사료된다.

이동상 및 칼럼의 검토

이동상 및 칼럼의 최적조건을 검토하였다. 이동상은 10%, 30%, 50%, 70% methanol에서, 칼럼은 amine 칼럼, ODS 칼럼 및 CN 칼럼에서 시행한 결과 이동상은 0.005M hexane sulfonic acid의 50% methanol에서 칼럼은 CN 칼럼에서 가장 양호한 분리능을 나타내었으며, 이 조건에서 액체크로마토그래프법을 행하였을 때 IU와 파라벤류 및 DU와 파라벤류의 각 크로마토그램 및 피크 유지시간은 Fig. 2 및 Table IV과 같았다.

검량선 작성

이미다졸리딘우레아와 파라벤류 - 표준액을 각각 5회씩 주입하여 Table III의 기기조건으로 얻은 내부표준물질에 대한 피크면적비를 종축으로, 표준액의 농도를 횡축으로하여 작성한 검량선은 Fig. 3와 같았다. 여기서 얻은 검량선의 상관계수는 IU 0.994, MP 0.9991, EP 0.9998, PP 0.9999 및 BP 0.9999로 직선성을 나타내었고 IU는 100-1250 µg/mL, 파라벤류는 60-1000 µg/mL 농도범위에서 정량성을 확인할 수 있었다.

디아졸리딘우레아와 파라벤류 - 표준액을 각각 5회씩 주입하여 Table III의 기기조건으로 얻은 내부표준물질에 대한 피크면적비를 종축으로, 표준액의 농도를 횡축으로하여 작성한 검량선

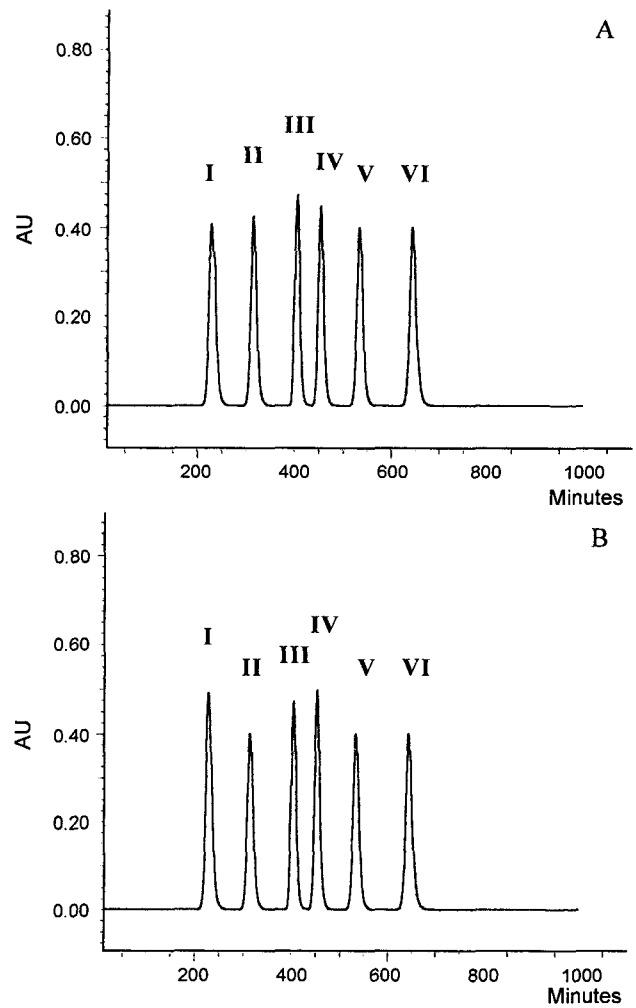


Fig. 2 - Chromatograms of standards solution. A: I: imidazolidinyl urea, II: caffeine (internal standard), III: methylparaben, IV: ethylparaben, V: propylparaben, VI: butylparaben, B: I: diazolidinyl urea, II: caffeine (internal standard), III: methylparaben, IV: ethylparaben, V: propylparaben, VI: butylparaben, Chromatographic conditions: as in Table 3.

Table IV - Retention times of preservatives

Fig	Compound	Retention Time (min)
A	I Imidazolidinyl urea	2.45
	II Caffeine (internal standard)	3.08
	III Methylparaben	4.07
	IV Ethylparaben	4.58
	V Propylparaben	5.41
	VI Butylparaben	6.56
B	I Diazolidinyl urea	2.51
	II Caffeine (internal standard)	3.05
	III Methylparaben	4.06
	IV Ethylparaben	4.53
	V Propylparaben	5.48
	VI Butylparaben	6.59

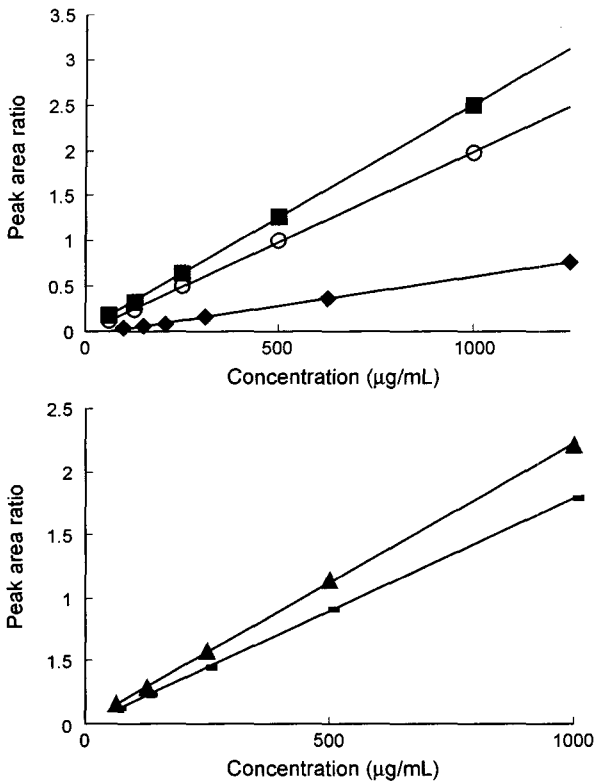


Fig. 3 - Calibration curves for standards by internal standard method (▲: ethylparaben, ◓: butylparaben, ■: methylparaben, ○: propylparaben, ◆: imidazolidinyl urea)

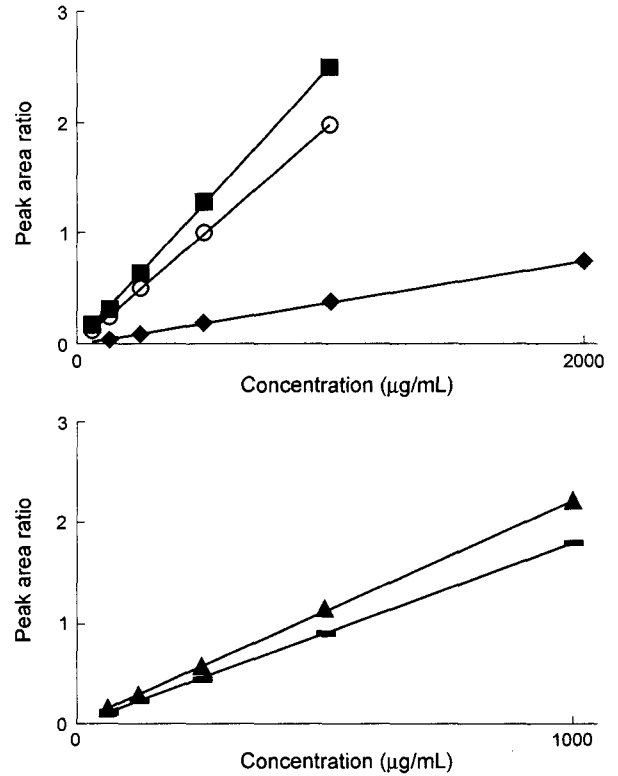


Fig. 4 - Calibration curves for standards by internal standard method (▲: ethylparaben, ◓: butylparaben, ■: methylparaben, ○: propylparaben, ◆: diazolidinyl urea)

은 Fig. 4와 같았다. 여기서 얻은 검량선의 상관계수는 DU 0.9998, MP 0.9991, EP 0.9998, PP 0.9999, BP 0.9999로 직선성을 나타내었고 DU는 120-2000 µg/mL, 파라벤류는 60-1000 µg/mL 농도범위에서 정량성을 확인할 수 있었다.

재현성 및 회수율 검토

표준액을 가지고 Table III의 기기조건으로 실험하여 얻은 재현성 결과는 Table V과 같았고, 상대표준 편차는 0.3~0.6%로 나타났다. 표준처방설계에 따라 만든 화장품 2종(Table II)을 검체로 하여 0.5 g씩 정밀하게 달아 내부표준액(용매A)을 넣어

30분간 초음파 진탕하고 30분간 원심분리(3,500 rpm)하여 상등액을 취해 여과하여 이 액을 가지고 시행한 회수율의 결과는 Table VI과 같았고, IU는 99.8~102.7%, DU는 96.6~101.4%, MP는 98.5~102.6%, EP는 98.5~105.7%, PP는 98.5~100.1%, BP는 97.5~101.0%로 양호한 재현성과 회수율을 나타내었다.

시판품의 정량

시중에 유통되고 있는 기초화장품 17종을 가지고 Table III의 기기조건에 따라 시험한 결과는 Table VII과 같았으며, 크로마토그램은 Fig. 5과 같았다.

Table V - Reproducibility and precision of IU and parabens by internal standard method

Component	Peak Area Ratio					Mean	RSD (%)
	1	2	3	4	5		
IU	0.1652	0.1652	0.1648	0.1652	0.1634	0.1648	0.5
DU	0.7441	0.7456	0.7428	0.7474	0.7416	0.7443	0.3
MP	0.7441	0.7456	0.7428	0.7474	0.7416	0.7443	0.3
EP	2.2194	2.2227	2.2189	2.205	2.2208	2.2173	0.3
PP	1.9826	1.9815	1.9637	1.9594	1.9605	1.9696	0.6
BP	1.8017	1.8021	1.8037	1.7913	1.7748	1.7951	0.6

*RSD : Relative standard deviation of five injection

Table VI – Recoveries of standards.

Sample	Components	Run					Mean	RSD* (%)
		1	2	3	4	5		
1	IU	102.1	101.7	98.9	102.7	99.0	100.9	1.77
	DU	99.2	99.2	99.3	96.6	98.3	98.5	1.16
	MP	100.7	102.6	101.6	101.2	101.2	101.4	0.70
	EP	100.9	99.7	101.8	102.5	100.3	101.0	1.12
	PP	99.8	100.5	98.5	99.3	98.9	99.4	0.77
	BP	98.2	97.8	99.5	99.2	98.3	98.6	0.73
2	IU	99.8	101.3	101.4	99.6	100.4	100.5	0.83
	DU	100.0	99.2	98.8	100.6	98.3	99.4	0.91
	MP	100.2	100.2	98.5	100.8	101.8	100.3	1.23
	EP	100.9	100.9	98.5	99.8	105.7	101.2	2.71
	PP	99.6	99.6	100.1	99.5	100.6	99.9	0.46
	BP	99.9	99.9	99.0	97.5	101.0	99.5	1.30

*RSD : Relative standard deviation of five injection

Table VII – Concentration of imidazolidinyl urea, diazolidinyl urea and parabens in commercial cosmetics

Sample No	Concentration and RSD (%)											
	IU		DU		MP		EP		PP		BP	
	Conc.	RSD	Conc.	RSD	Conc.	RSD	Conc.	RSD	Conc.	RSD	Conc.	RSD
1	-	-	-	-	0.2	0.29	0.09	0.68	-	-	-	-
2	-	-	-	-	0.1	2.66	-	-	-	-	-	-
3	0.18	0.01	-	-	0.15	0.28	-	-	0.03	2.99	-	-
4	0.34	1.08	-	-	0.17	1.34	0.08	2.40	-	-	-	-
5	0.17	0.39	-	-	0.15	0.15	0.02	1.88	-	-	-	-
6	0.22	0.34	-	-	0.06	0.35	0.24	0.68	0.08	1.11	-	-
7	0.2	1.31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	-	0.27	0.06	0.05	1.83	0.09	0.97	0.04	0.35
9	-	-	-	-	0.1	2.59	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	0.15	0.04	-	-	0.03	0.29	-	-
11	-	-	-	-	0.24	0.05	0.01	1.95	0.06	0.33	-	-
12	-	-	-	-	0.20	0.81	-	-	-	-	-	-
13	-	-	0.09	1.24	0.19	1.56	-	-	-	-	-	-
14	-	-	0.07	3.26	0.2	2.25	-	-	-	-	0.11	2.81
15	-	-	0.08	2.81	0.18	2.99	0.02	0.62	-	-	-	-
16	-	-	0.16	1.85	0.07	0.47	-	-	-	-	-	-
17	-	-	0.08	3.24	0.28	0.73	-	-	0.05	0.12	0.12	0.45

*RSD : Relative standard deviation of five injection

결 론

기초 화장품 중에 사용하는 살균·보존제 성분 중 imidazolidinyl urea와 paraben류 및 diazolidinyl urea와 paraben류를 동시분리 전량 하기 위하여 액체크로마토그래프법을 적용하여 실험한 결과를 다음과 같았다.

1. 검액조제는 50% methanol을 용매로 사용한 내부표준액(용매 A)을 넣어 30분간 초음파 진탕하고 30분간 원심분리(3,500 rpm)하여 상등액을 취해 여과하였을 때 회수율 및 상대표준편차가 가장 양호하였다.

2. 액체크로마토그래프법의 분석조건은 CN 칼럼과 이동상으로서 0.5 mM hexanesulfonic acid의 50% methanol용액을 사용하여 측정파장 228 nm, 칼럼 온도 상온에서 하여 분석하였을 때 최적이었다.

3. 내부표준법에 의하여 검량선을 작성하였을 때 IU는 100~1250 µg/mL, DU 120~2000 µg/mL는 파라벤류는 60~1000 µg/mL 농도범위에서 정량성이 있었으며 각각의 회수율은 IU는 99.8~102.7%, DU는 96.6~101.4%, MP는 98.5~102.6%, EP는 98.5~105.7%, PP는 98.5~100.1%, BP는 97.5~101.0%로 양호한 결과를 나타내었다.

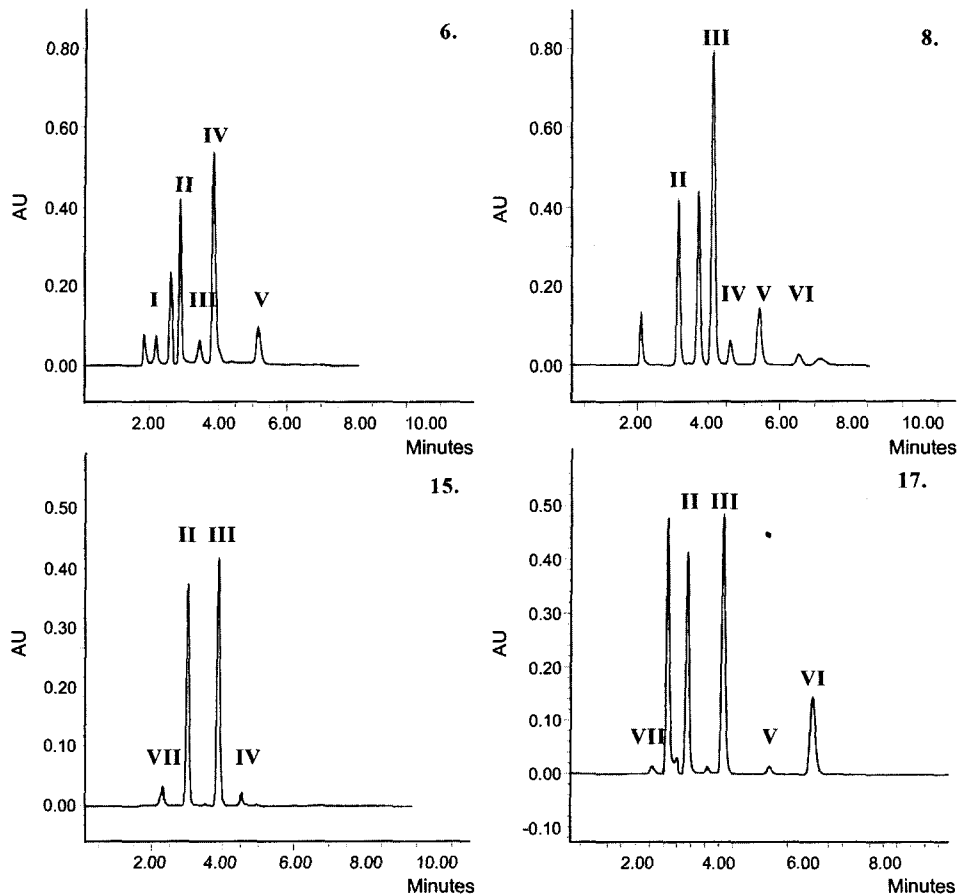


Fig. 5 - Chromatogram of commercial cosmetics (sample NO. 6, 8, 15, 17). I: imidazolidinyl urea, II: caffeine (internal standard), III: methylparaben, IV: ethylparaben, V: propylparaben, VI: butylparaben, VII: diazolidinyl urea.

4. 상기 조건에서 IU 또는 DU와 파라벤은 7분 이내에 신속 정확하게 동시 분리 정량할 수 있었다.

5. 시판되고 있는 17종의 기초화장품에 대하여 본 시험법을 적용하였을 때, 배합한도 이상의 살균·보존제는 검출되지 않았고, IU, DU 및 파라벤류는 정량성 있게 검출되었다.

이상의 시험결과와 같이 기초화장품에 본 시험법을 적용한 결과 IU와 파라벤류 및 DU와 파라벤류를 각각 동시에 신속, 정확하게 분리 정량할 수 있었으며, 재현성이 우수하여, 본 시험법을 화장품 공정시험법의 기초 자료로 활용 및 부정·불량 화장품 색출에 기여할 것으로 사료된다.

문 헌

- Berke, P. A., Steinberg D. C., Rosen W. E. : Germaben II a complete preservative system in clear liquid form. *Cosmet Toiletries*. **97**, 89 (1982).
- Berke P. A., Steinberg D. C., Rosen W. E. : Germall II a new broad-spectrum cosmetic preservative. *Cosmet Toiletries*. **97**, 49 (1982).
- Jackson E. M. : Substantiating the efficacy of thigh creams. *Cosmet. Toiletries*. **8**, 27 (1995).
- Berke P. A., Rosen W. E. : Are cosmetic emulsions adequately preserved against pseudomonas?. *J. Soc Cosmet Chem*. **31**, 37 (1980).
- Skinner SL, Marks JG. : Allergic contact dermatitis in topical medicaments. *Am J Contact Dermat*. **9**, 199 (1998).
- Amouroux I, Pesando D, Noël H, Girard JP : Mechanism of cytotoxicity by cosmetic ingredients in sea urchin eggs. *Arch Environ Contam Toxicol*. **36**, 28 (1999).