

HPLC를 이용한 양모제 유효성분의 동시분석법

권 경 진 · 김 도 정 · 김 상 섭 · 최 유 빈 · 김 미 정 · 최 명 신 · 최 보 경[†] · 김 동 섭

식품의약품안전평가원 화장품연구팀
(2010년 6월 30일 접수, 2010년 8월 11일 수정, 2010년 8월 21일 채택)

Analytical Methods on the Determination of Active Ingredients for Hair Nourisher Products

Kyoung Jin Kwon, Do Jung Kim, Sang Seop Kim, Yu Bin Choi, Mi Jeong Kim, Myeong Sin Choi,
Bo Kyung Choi[†], and Dong Sup Kim

Cosmetics Research Team, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, KFDA,
Nokbeon-dong, Eunpyeong-gu, Seoul 122-704, Korea
(Received June 30, 2010; Revised August 11, 2010; Accepted August 21, 2010)

요약: 탈모 방지의 목적으로 사용되는 양모제는 현재 우리나라에서 의약품이며 약사법으로 관리되고 있다. 최근 탈모에 대한 사회적 관심이 증가하면서 양모제에 대한 수요도 증가하고 있는 실정이지만 양모제는 생약추출물, 비타민류, 보존제 등 다양한 종류의 성분이 혼합되어 있어 분석이 쉽지 않다. 본 연구에서는 양모제의 주성분으로 많이 쓰이는 니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 초산토코페롤, 니코틴산벤질에 대한 동시분석법을 확립하고자 하였다. 시판 중인 양모제를 구입하여 C₁₈ 컬럼, 아세트니트릴과 인산염완충액을 용매로 사용하여 HPLC로 분석하였다. 검출은 자외부흡광광도계를 이용하여 220, 270, 300 nm 파장에서 분석하였으며, 12.5 ~ 800 µg/mL 농도범위에서 검량선을 작성하였다. 회수율은 액상기체의 경우 97.3 ~ 103.5 % (상대표준편차 0.9 ~ 2.8 %), 샴푸기체의 경우 101.9 ~ 115.9 % (상대표준편차 0.7 ~ 7.7 %)로 양호한 결과를 나타냈다. 시판 중인 검체의 함량 시험결과 기준에 적합하였으며, 본 분석법을 이용하여 품질관리 및 추후 양모제 개발에 유용하게 활용함으로써 우수한 품질의 양모제 유통에 크게 기여할 것으로 기대된다.

Abstract: The hair nourisher products are used for prevention of hair loss and classified as quasi-drug in Korea. As concerns about hair loss has been increased, the demand for hair nourisher products has been growing. It is difficult to analyze their main ingredients because they contain various ingredients including natural plant extracts, vitamins, preservatives and exfoliators. The purpose of this study was to develop and validate simultaneous analytical methods of active ingredients in hair nourisher products such as nicotinamide, tocopherol, salicylic acid, dexpanthenol and benzyl nicotinate by HPLC. The active ingredients were separated on a C₁₈ column by using acetonitrile/phosphate buffer as a mobile phase, and detected at UV 220, 270 and 300 nm. The calibration curve showed linearity in the range of 12.5 ~ 800 µg/mL and the recoveries were 97.3 ~ 103.5 % (RSD 0.9 ~ 2.8 %) in liquid matrix and 101.9 ~ 115.9 % (RSD 0.7 ~ 7.7 %) in shampoo matrix. Validated method was applied to hair nourisher products obtained from distribution market. Fortunately, all samples met their criteria. This study might be expected to provide the method for determining active ingredients in hair nourisher products and lead to promote a rapid market entry.

Keywords: hair nourisher products, quasi-drug, HPLC, simultaneous analytical methods, UV-dioarray

[†] 주 저자 (e-mail: hercbk@korea.kr)

1. 서 론

현재 우리나라에서 발모제는 “의약품”으로, 양모제는 “의약외품”으로 관리되고 있으며, 양모제의 경우 미국, 유럽에서는 화장품으로 관리되고 있다. 환경적인 요인과 더불어 현대인의 스트레스로 인한 젊은 층의 탈모로 사회적 관심이 높아지면서 발모제나 양모제 등에 대한 사용이 증가하고 있다.

양모제의 주성분으로는 니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 초산토코페롤, 아연피리치온, 비오틴 등이 주로 사용되며, 그 밖에도 다양한 생약추출물과 보습제, 계면활성제, 보존제 등 10 ~ 40여 가지의 다양한 성분이 혼합되어 있다. 일부 의약품이나 화장품에서 한두 가지 성분을 HPLC로 분석한 논문은 있었으나[1-11] 생약추출물이 혼합된 양모제에서 다양한 성분들을 분석한 논문은 찾지 못하였다. 이에 따라 본 연구에서는 양모제 주요 성분으로 사용되는 니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 초산토코페롤, 니코틴산벤질 등 각 성분들을 분석한 논문 등을 참고로 하여 성분 특성에 적합한 동시분석법을 개발하였다. 이 방법으로 동시분석을 통해 분석시간을 단축시키고 품질관리에 적절한 방법이 되도록 하였으며 시험법 검증을 통해 적정함을 검증하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 시약

표준품으로 니코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤, 텍스판테놀, 니코틴산벤질을 사용하였으며, 모두 Sigma-Aldrich (USA)사에서 구입하였다. 아세트니트릴, 인산이수소칼륨, 1-헥산설포산나트륨은 모두 Sigma-Aldrich (USA)사에서 구입하였으며, 아세트니트릴은 HPLC급을 사용하였다. 회수율시험에 사용된 양모제 주성분을 제외한 성분구성의 액상, 삼푸 형태의 기체는 아모레퍼 시픽에서 제공받았다.

2.2. 기기

HPLC분석은 시료자동주입장치, 다이오드어레이검출기(DAD)가 연결된 US/2695-Alliance (Waters, USA)를 사용하여 실험을 실시하였으며, 분석결과는 Empower waters data system 소프트웨어(Waters, USA)를 사용하여 산출하였다.

2.3. 표준액/공시험액의 조제

2.3.1. 동시분석법-I

시험에 사용된 표준액의 농도범위는 시판중인 양모제 제품의 사용농도를 고려하여 설정하였다. 니코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤 동시분석법의 경우, 아세트니트릴에 녹여 400, 800, 1,600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준원액을 만들고, 이 원액을 1/2배씩 희석하여 니코틴산아미드 12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 살리실산 25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 초산토코페롤 50 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 범위의 표준액을 5개씩 조제하였다. 공시험액은 용매로 사용된 아세트니트릴로 하여 분석하였다.

2.3.2. 동시분석법-II

니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 니코틴산벤질 동시분석법의 경우, 인산염완충액에 녹여 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (니코틴산아미드, 니코틴산벤질)과 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (텍스판테놀, 살리실산)의 표준원액을 만들고, 이 원액을 1/2배씩 희석하여 12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (니코틴산아미드, 니코틴산벤질), 25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (텍스판테놀, 살리실산) 범위의 표준액을 5개씩 조제하였다. 용매로 사용된 인산염완충액은 인산이수소칼륨 1.36 g을 물 1,000 mL에 넣어 녹이고 1 mol/L 인산으로 pH를 2.7로 조정하였다. 공시험액은 용매로 사용된 인산염완충액으로 하여 분석하였다.

2.4. 검액의 조제

2.4.1. 동시분석법-I

니코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤을 함유한 양모제 2종을 검체로 하여 검체 약 1.0 g을 정밀하게 달아 아세트니트릴 적당량을 넣어 초음파로 충분히 분산시킨 다음 아세트니트릴을 넣어 50 mL로 한 액을 여과하여 검액으로 하였다.

2.4.2. 동시분석법-II

니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 니코틴산벤질을 함유한 양모제 9종을 검체로 하여 검체 약 1.0 g을 정밀하게 달아 인산염완충액 적당량을 넣어 초음파로 충분히 분산시킨 다음 인산염완충액을 넣어 50 mL로 한 액을 여과하여 검액으로 하였다.

2.5. 회수율용액의 조제

2.5.1. 동시분석법- I

양모제 주성분이 함유되지 않은 액상 기체 1 g을 50 mL 플라스크에 취하고 니코틴산아미드 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 살리실산 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 초산토코페롤 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 첨가하고 아세토니트릴을 소량 넣어 녹여 초음파를 이용하여 균질화한다. 아세토니트릴을 더 넣어 50 mL이 되도록 하고 여과하여 HPLC로 분석하였다.

2.5.2. 동시분석법- II

양모제 주성분이 함유되지 않은 액상 기체와 샴푸 기체 각각 1 g을 50 mL 플라스크에 취하고 니코틴산아미드 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 텍스판테놀 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 살리실산 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 니코틴산벤질 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 가 되도록 첨가하고 인산염 완충액을 소량 넣어 녹여 초음파를 이용하여 균질화한다. 각각 인산염완충액을 더 넣어 50 mL가 되도록 하고 여과하여 HPLC로 분석하였다.

2.6. 기기분석 조건

분석 칼럼은 길이 15 cm, 내경 4.6 mm, 입자크기 5 μm 인 XTerra[®] C₁₈ (Waters) 칼럼을 사용하였고, 이동상은 아세토니트릴과 0.1 % 1-헥산설폰산나트륨 함유한 0.01 mol/L 인산염완충액(pH 2.7)을 사용하였다(Table 1). 이동상으로 사용된 인산염완충액은 인산이수소칼륨 1.36 g과 1-헥산설폰산나트륨 1.0 g을 물 1,000 mL에 넣어 녹이고 1 mol/L 인산으로 pH를 2.7로 조정하여 조제하였다.

2.6.1. 동시분석법- I

검출파장은 니코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤이 모두 검출될 수 있는 220 nm 파장에서 분석하였으며, 표준액 및 검액을 20 μL 씩 주입하여 분석하였다(Figure 1).

2.6.2. 동시분석법- II

검출파장은 니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 니코틴산벤질 각 성분이 검출될 수 있도록 220 nm (텍스판테놀), 270 nm (니코틴산아미드, 니코틴산벤질), 300 nm (살리실산) 파장에서 분석하였다. 220 nm에서도 성분 모두가 검출되기는 하나 검체의 다른 성분에 의해 검출 능에 영향이 있어 텍스판테놀을 제외한 성분은 각 성분의 특이적인 파장에서 분석하였다. 표준액 및 검액을 20 μL 씩 주입하여 분석하였다(Figure 1).

Table 1. Gradient Profile Program of the Mobile Phase

		0.01 mol/L phosphate Time buffer containing 0.1 % Acetonitrile Flow rate (min) hexane sulfonic acid (%) (mL/min) sodium salt (%)		
Method 1	0	90	10	0.7
	4	90	10	0.7
	7	80	20	1.0
	13	80	20	1.0
	23	0	100	1.0
	30	0	100	1.0
Method 2	0	100	0	1.2
	7	100	0	1.2
	12	70	30	1.2
	17	70	30	1.2
	23	30	70	1.2
	25	30	70	1.2
	30	100	0	1.0
40	100	0	1.0	

3. 결 과

3.1. 직선성(Linearity)

3.1.1. 동시분석법- I

니코틴산아미드(12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 살리실산(25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 초산토코페롤(50 ~ 800 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 5개 농도의 표준액을 가지고 3회 분석하여 얻은 검량선과 검량선식을 Figure 2와 Table 2에 나타내었다. 3가지 성분 모두 0.9992 이상의 직선성을 나타내었다.

3.1.2. 동시분석법- II

니코틴산아미드(12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 텍스판테놀(25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 살리실산(25 ~ 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 니코틴산벤질(12.5 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 5개 농도의 표준액을 가지고 3회 분석하여 얻은 검량선과 검량선식을 Figure 2와 Table 2에 나타내었다. 4가지 성분 모두 0.9996 이상의 직선성을 나타내었다.

3.2. 정밀성(Precision)과 재현성(Repeatability)

3.2.1. 동시분석법- I

본 분석시스템의 정밀도(재현성) 여부를 측정하기 위

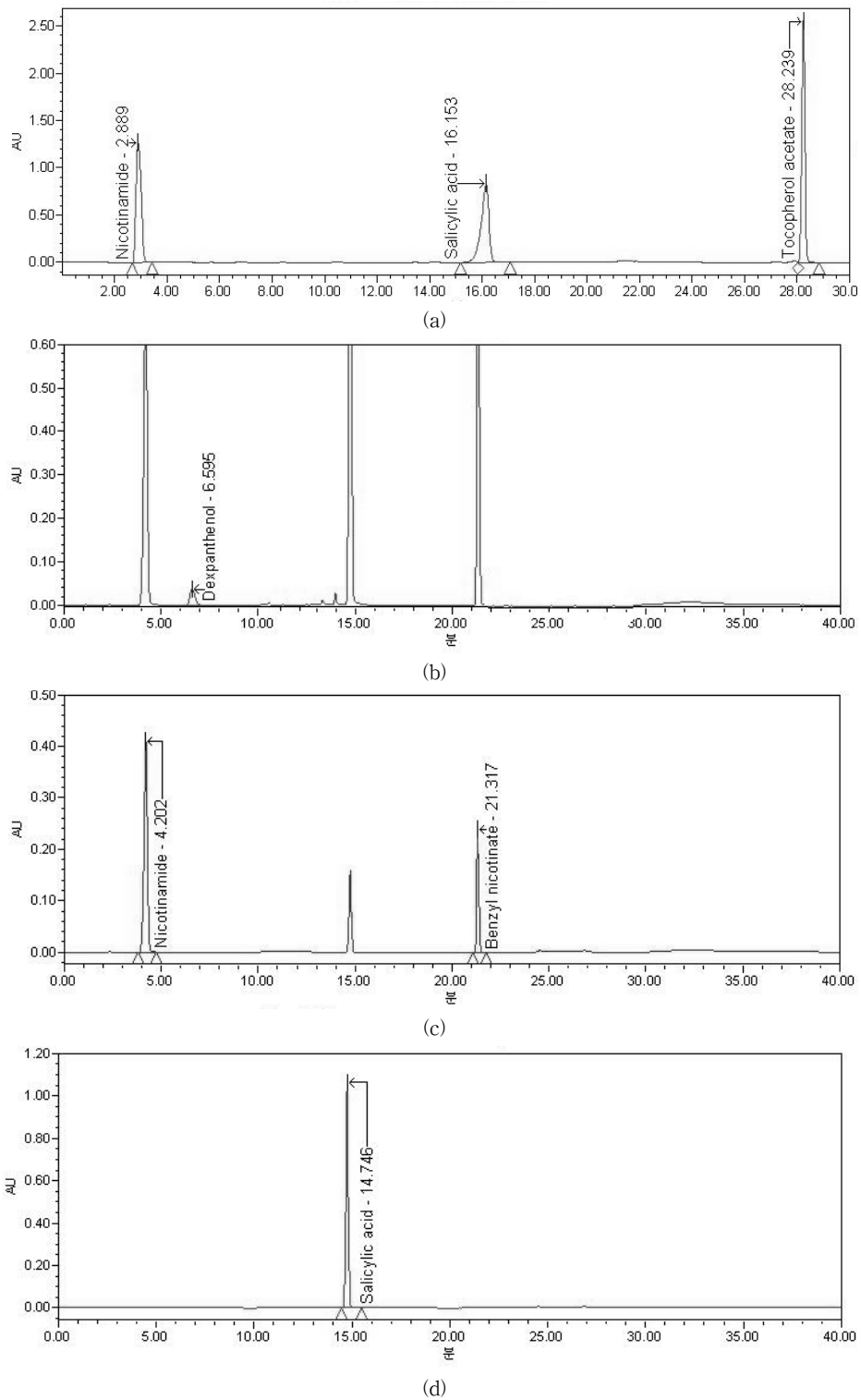
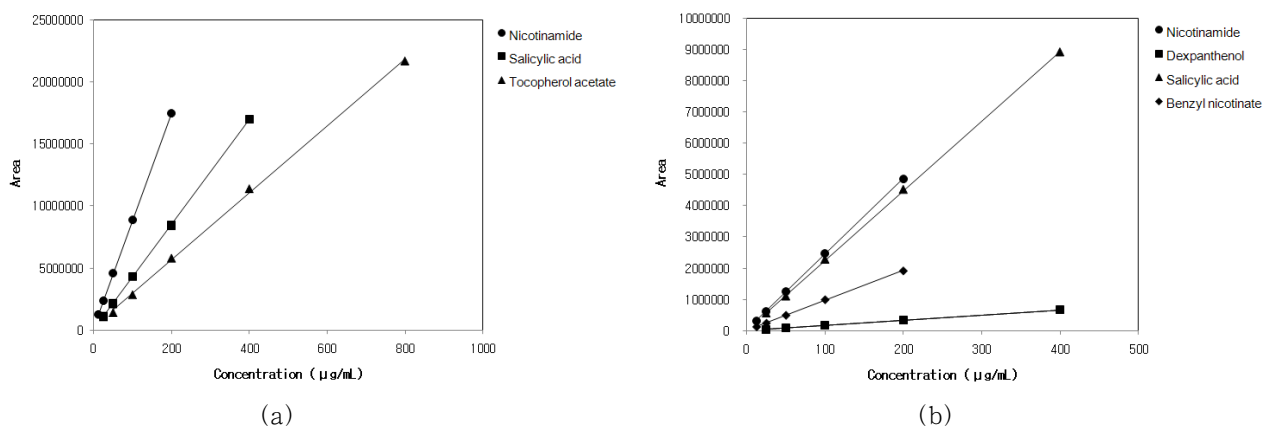


Figure 1. HPLC chromatogram of standard solution. (a) method-1 (220 nm), (b) method-2 (220 nm), (c) method-2 (270 nm), (d) method-2 (300 nm).

Table 2. Results of Linearity Test

	Compounds	Range	Equation for regression line	Correlation coefficient
Method 1	Nicotinamide	12.5 ~ 200	$y = 86469x + 215025$	1.0000
	Salicylic acid	25 ~ 400	$y = 42425x + 14938$	0.9999
	Tocopherol acetate	50 ~ 800	$y = 26983x + 279643$	0.9992
Method 2	Nicotinamide	12.5 ~ 200	$y = 24240x + 24371$	0.9999
	Dexpanthenol	25 ~ 400	$y = 1670.1x + 709.85$	0.9999
	Salicylic acid	25 ~ 400	$y = 22310x + 22522$	0.9999
	Benzyl nicotinate	12.5 ~ 200	$y = 9593.6x + 17770$	0.9996

**Figure 2.** Calibration curves of standard solutions. (a) method-1, (b) method-2.

해 3가지 성분의 표준액을 5개 농도별로 일 내(intra-repeatability) 및 일 간(inter-repeatability) 3회씩 분석한 결과 면적값 상대표준편차는 0.59 ~ 3.68 % (일 내) 및 0.83 ~ 3.43 % (일 간)의 범위로 매우 양호함을 알 수 있었다(Table 3).

3.2.2. 동시분석법-Ⅱ

본 분석시스템의 정밀도(재현성) 여부를 측정하기 위해 4가지 성분의 표준액을 5개 농도별로 일 내(intra-repeatability) 및 일 간(inter-repeatability) 3회씩 분석한 결과 면적값 상대표준편차(relative standard deviation, RSD)는 0.62 ~ 7.41 % (일 내) 및 0.64 ~ 5.91 % (일 간)의 범위로 양호함을 알 수 있었다(Table 3).

3.3. 정확성(Accuracy)과 회수율(Recovery)

3.3.1. 동시분석법-Ⅰ

본 분석법의 적용대상 물질의 조합으로 된 제품은 주로 “액상 기제” 형태로 시판되고 있었으며, 본 기제에 니

코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤 각각을 검량선 범위의 중간 농도인 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 해당되도록 첨가하여 3회 분석한 결과 그 회수율은 Table 4에 나타난 바와 같이 니코틴산아미드, 살리실산, 초산토코페롤 각각 100.0, 100.0, 100.5 %였다.

3.3.2. 동시분석법-Ⅱ

본 분석법의 적용대상 물질의 조합으로 된 제품은 주로 “액상 기제” 또는 “샴푸 기제” 형태로 시판되고 있었으며, 본 기제에 니코틴산아미드, 텍스판테놀, 살리실산, 니코틴산벤질 각각을 검량선 범위 내에서 20, 40, 40, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에 해당되도록 첨가하여 3회 분석한 결과 회수율은 액상 기제에서 97.3 ~ 103.5 %, 샴푸 기제에서 101.9 ~ 115.9 %로 Table 4에 나타난 바와 같다.

3.4. 제품에의 적용(Application)

실제 시판중인 양모제 제품 에센스액 형태와 샴푸 형태 11종을 설정된 방법으로 분석한 결과를 Table 5에 나타내었으며, 제품 모두 함량기준(표시량 대비 90 % 이

Table 3. Results of Intra- and Inter-Repeatability Test

(A) Method 1

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Nicotinamide		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Salicylic acid		Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Tocopherol acetate	
	Intra RSD (%)	Inter RSD (%)		Intra RSD (%)	Inter RSD (%)		Intra RSD (%)	Inter RSD (%)
12.5	0.60	3.00	25	3.68	1.82	50	0.60	0.98
25	2.17	0.83	50	1.74	3.43	100	0.46	2.52
50	2.38	0.94	100	2.02	1.69	200	1.90	0.85
100	1.24	1.79	200	0.60	1.37	400	0.59	1.16
200	2.28	0.91	400	1.27	1.34	800	0.82	1.55

(B) Method 2

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Nicotinamide		Dexpanthenol	
	Intra RSD (%)	Inter RSD (%)	Intra RSD (%)	Inter RSD (%)
12.5	5.93	3.65	7.41	4.30
25	0.68	3.90	4.04	2.21
50	0.68	2.98	4.05	3.31
100	0.62	4.55	3.62	3.87
200	0.79	2.45	4.13	1.07

Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Salicylic acid		Benzyl nicotinate	
	Intra RSD (%)	Inter RSD (%)	Intra RSD (%)	Inter RSD (%)
25	1.67	1.29	6.12	2.02
50	3.81	2.22	2.22	3.33
100	4.33	2.95	2.19	3.43
200	3.99	0.64	2.65	5.91
400	3.37	2.22	2.40	3.51

Table 4. Results of Recovery Test (n = 3)

	Nicotinamide (%)	Dexpanthenol (%)	Salicylic acid (%)	Tocopherol acetate (%)	Benzyl nicotinate (%)
Method 1 (liquid type)	100.0 \pm 2.0	-	100.0 \pm 2.4	100.5 \pm 2.8	-
Method 2 (liquid type)	102.3 \pm 1.0	103.1 \pm 0.9	97.3 \pm 2.5	-	103.5 \pm 1.9
Method 2 (shampoo type)	101.9 \pm 0.7	102.4 \pm 1.3	107.2 \pm 7.7	-	115.9 \pm 2.8

상)에 적합하였다. 이로 보아 시판 중인 제품의 농도범위 내에서 본 분석법의 적용이 적합함을 확인할 수 있었다.

4. 고 찰

개발된 본 분석법은 양모제에서 적용가능한 농도범위에서 HPLC로 분석가능한 양모제 성분의 함량을 분석할

수 있었으며 대부분 형태의 제품에서 분석이 가능하였다. 다양한 양모제 조성을 고려할 때 각각의 주성분을 개별로 분석하는 것보다 3 ~ 4가지 성분을 동시에 분석하여 간편하고 신속하므로 추후 양모제를 개발하거나 품질 관리를 수행함에 있어 분석비용 및 분석시간 면에서 효율성이 크다고 할 수 있다.

Table 5. Results of Products on the Market

	Products	Nicotinamide (%)	Dexpanthenol (%)	Salicylic acid (%)	Tocopherol acetate (%)	Benzylnicotinate (%)
Method 1	1	125.7	-	113.2	144.5	-
	2	118.0	-	107.0	111.4	-
Method 2	3	125.9	133.0	-	-	-
	4	98.7	103.7	-	-	-
	5	100.8	95.2	-	-	-
	6	-	95.1	98.9	-	-
	7	-	94.0	95.8	-	-
	8	-	106.7	112.2	-	-
	9	-	95.4	96.2	-	-
	10	97.2	-	-	-	92.4
	11	100.4	-	-	-	96.7

감사의 글

본 연구는 2009년도 식품의약품안전청 연구개발비 지원(09101화장품272)에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

- N. M. Almeida, J. M. Alves, D. C. Patto, C. R. Lima, J. S. Quenca-Guillen, M. I. Santoro, and E. R. Kedor-Hackmann, Determination of tocopheryl acetate and ascorbyl tetraisopalmitate in cosmetic formulations by HPLC, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **31**(6), 445 (2009).
- A. el-Gindy, F. el-Yazby, A. Mostafa, and M. M. Maher, HPLC and chemometric methods for the simultaneous determination of cyproheptadine hydrochloride, multivitamins, and sorbic acid, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**(4), 7033 (2004).
- A. Gentili, F. Caretti, G. D'Ascenzo, S. Marchese, D. Perret, D. Di Corcia, and L. M. Rocca, Simultaneous determination of water-soluble vitamins in selected food matrices by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.*, **22**(13), 2029 (2008).
- U. Höller, C. Brodhag, A. Knöbel, P. Hofmann, and V. Spitzer, Automated determination of selected water-soluble vitamins in tablets using a bench-top robotic system coupled to reversed-phase (RP-18) HPLC with UV detection, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **31**(1), 151 (2003).
- H. J. Jeong, M. H. Lee, K. W. Ro, C. W. Hur, and J. W. Kim, Determination of Panthenol, Cholecalciferol and Tocopherol in Cosmetic Products by Gas Chromatography-Mass Spectrometry in SIM Mode, *Int. J. Cosmet. Sci.*, **21**(1), 41 (1999).
- L. Krcmová, L. Urbánek, D. Solichová, M. Kaspárová, H. Vlcková, B. Melichar, L. Sobotka, and P. Solich, HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy, *J. Sep. Sci.*, **32**(15-16), 2804 (2009).
- A. U. Kulikov and A. A. Zinchenko, Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **19**:43(3), 983 (2007).
- D. Siluk, R. V. Oliveira, M. Esther-Rodriguez-Rosas, S. Ling, A. Bos, L. Ferrucci, and I. W. Wainer, A validated liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **44**(4), 1001 (2007).
- N. Ramos-Martos, F. Aguirre-Gómez, A. Molina-Díaz, and L. F. Capitán-Vallvey, Application of liquid chromatography to the simultaneous determi-

- nation of acetylsalicylic acid, caffeine, codeine, paracetamol, pyridoxine, and thiamine in pharmaceutical preparations, *J. AOAC Int.*, **84**(3), 676 (2001).
10. B. O. Silva, First derivative spectrophotometric and high performance liquid chromatographic simultaneous determination of benzoic and salicylic acids in pharmaceutical preparations, *Nig. Q. J. Hosp. Med.*, **18**(2), 92 (2008).
 11. S. Vidović, B. Stojanović, J. Veljković, L. Prazić-Arsić, G. Roglić, and D. Manojlović, Simultaneous determination of some water-soluble vitamins and preservatives in multivitamin syrup by validated stability-indicating high-performance liquid chromatography method, *J. Chromatogr. A.*, **1202**(2), 155 (2008).