

LC/MS를 이용한 화장품 중의 parabens 동시 분석 방법 연구

박교범 · 이석근★

한국화학연구원 화학분석센터
(2009. 12. 7. 접수, 2010. 1. 4. 승인)

Simultaneous determination of parabens in cosmetics by LC/MS

Gyo-Beom Park and Sueg-Geun Lee★

Center for Chemical Analysis, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon 305-343, Korea
(Received December 7, 2009; Accepted January 4, 2010)

요 약: 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS)을 이용하여 화장품에 들어있는 파라벤류등을 동시 분석하였다. 화장품 시료를 메탄올에 직접 용해시키고 0.45 μm 필터로 여과하여 메탄올/물을 이동상으로 하여 Extend C18의 비극성 컬럼을 사용하여 기온기 용리 조건에서 12분 안에 분리하여 SIM(selected ion monitoring)방법으로 정량하였다. LC/MS 분석결과 검량선은 0.05-10 $\mu\text{g/mL}$ 농도범위에서 $r^2=0.9993$ 의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 0.01 $\mu\text{g/mL}$ 이었다.

Abstract: The simultaneous analysis of parabens in cosmetic samples was carried out by LC/MS. The cosmetic samples are directly dissolved in methanol and filtered using 0.45 μm filter. The methanol-water was used for the mobile phase of gradient conditions. An Extend C₁₈ reverse-phase column and the selected ion monitoring (SIM) mode were applied. The analysis results of LC/MS showed good linearity with correlation coefficient of $r^2=0.9993$ in the range of 0.05 to 10 $\mu\text{g/mL}$ and detection limit of 0.01 $\mu\text{g/mL}$.

Key words: paraben, LC/MS

1. 서 론

파라벤은 비휘발성 물질로 독성이 약하고 화학적으로 안정하고 항균성이 좋아 화장품, 식품, 의약품, 음료수 및 생활용품 등의 미생물 방지 보존제로 광범위하게 사용되고 있으며, 기본 구조는 파라옥시안식향산을 포함하는 alkyl ester로서 methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- 등으로 나뉘며 항균성 효율은 alkyl ester의 사

슬이 길면 항균성은 증가하나 물에 대한 용해도가 낮기 때문에 대부분 알킬체인이 짧은 메틸파라벤을 일반적으로 사용하고 있다.^{1,2}

화장품 제조 과정에서 보존제로 파라벤을 첨가 할 때 한 가지 또는 그 이상의 파라벤을 혼합하여 사용하면 미생물의 오염으로부터 더 잘 견디는 시너지효과가 있다.³ 또한 파라벤은 생분해성과 저비용으로 무색, 무취, 무맛으로 굳어지는 특성이 없으며⁴ pH 4.5-

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-860-7710 Fax : +82-(0)42-860-7794

E-mail : leesg@pado.kRICT.re.kr

7.5 사이에서도 화학적으로 안정하고 수화로 인하여 항균성이 떨어지지 않는 특성이 있다.

한편, 화장품은 피부, 머리카락, 머릿속, 입술, 근육, 손톱 등 모든 부위에 사용되고 있으며 소비의 증가에 따라 피부염⁵과 알러지 등을 일으키는 부작용도 발생하고 있다.

Routled *et al*⁶에 의하면 파라벤을 동물들 상대로 실험한 결과 생체 내에서 에스트로게닉 효과가 있다고 밝혀졌으며 Oishi⁷의 보고에 의하면 프로필파라벤과 부틸파라벤은 에스트로게닉 활성화에 영향을 미쳐 남자의 생식계통이나 테스토테론의 분비에 영향이 있다고 하였다.

따라서 유럽연합에서는 일반적으로 화장품에 사용하는 파라벤의 허용농도는 단일 파라벤을 사용할 경우 0.4% 이하이고, 몇 가지 파라벤을 혼합하여 사용할 경우에는 전체 파라벤의 농도가 0.8%를 넘지 않도록 규제하고 있다.

점차 화장품의 소비가 증가하면서 화장품에 들어 있는 보존제를 동시분석하고 모니터링할 수 있는 방법이 필요한 일이며 화장품은 그 자체의 구성성분이 다양하고 방해물질이 많이 존재하므로 이를 해결하기 위해서는 신속하면서도 정확한 분석방법이 확립되어야 할 것이다. 지금까지 알려진 파라벤의 분석방법은 GC⁸⁻¹⁰ 및 GC/MS¹¹로 분석하는 방법과 HPLC¹²⁻¹⁶와 UV나 전기화학 검출기를 이용하는 방법, 그리고 Capillary Electrophoresis¹⁷⁻²¹로 분석하는 방법들이 있지만 이러한 방법들은 복잡한 매질을 가지고 있는 화장품에서 추출을 포함한 여러 가지 전처리 과정이 필요하다. 특히 GC 및 GC/MS를 이용한 방법은 유도체화를 해야 하는 번거로움이 있다.

따라서 본 연구에서는 전처리 및 유도체화 없이 화장품에서 파라벤을 직접 분석하기 위하여 LC/MS를 이용한 분석방법을 연구하였다. 이 분석방법은 국내에서 시판되고 있는 화장품을 대상으로 각각의 화장품 시료 0.5 g을 메탄올 5 mL에 넣고 10 분간 초음파 처리 후 0.45 µm의 필터를 사용하여 여과한 다음 여액을 직접 주입하여 LC/MS-SIM 방법으로 정량하였다.

분석 결과 국내산 화장품 14 개 제품중에서 모두 파라벤이 검출되었으며 파라벤의 농도는 0.03-0.43% 이었으며, 한 종류의 파라벤을 사용하기보다 두 가지 이상 혼합하여 사용하고 있음을 알 수 있었다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 표준물질로 사용된 메틸파라벤(99%), 에틸파라벤(99%), 프로필파라벤(99%),부틸파라벤(99%)은 Accu Standard사(New Haven, USA)로부터 구입하였고 메탄올 및 아세토니트릴은 Berdick & Jackson사(Muskegon, MI, USA)의 HPLC급 고순도 용매를 구입하여 사용하였다. 이때 사용한 파라벤류 각각의 구조식은 Fig. 1에 나타내었다.

시료를 용매에 녹이기 위해서 초음파 진동기(Fisher Scientific state/ultrasonic FS-28)를 사용하였고 여과는 0.45 µm (Millipore, Bedford, USA) syringe filter를 사용하였다.

2.2. LC/ESI-MS 기기 및 조건

본 연구에서 사용한 LC/MS는 HP-1100 Series liquid chromatograph/HP 1100 Series mass selective detector(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 구성된 것을 사용하였으며, MS의 이온화 방식은 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI)법의 negative mode이고, 이온의 분리 방식은 사중극자 질량 분리관이 부착된 LC/MSD를 이용한 역상 액체 크로마토그래피에 의하여 분석하였다. 분리조건으로는 Extend-C₁₈(150 mm×4.6 mm i.d., 3.5 µm) 칼럼을 사용하였으며, 이동상은 10 mM ammonium acetate를 포함한 수용액 (A)과 메탄올 (B)을 사용하여 초기에 B를 50%의 조성으로 시작하여 13분 까지 B를 90%의 조성이 되도록 기울기 용리 조건으로 하였으며, 이때 유속은 0.4 mL/min 이었다.

전자분무이온화법의 분석조건은 drying gas로 질소(99.99%)를 10 L/min의 유량으로 사용하였으며,

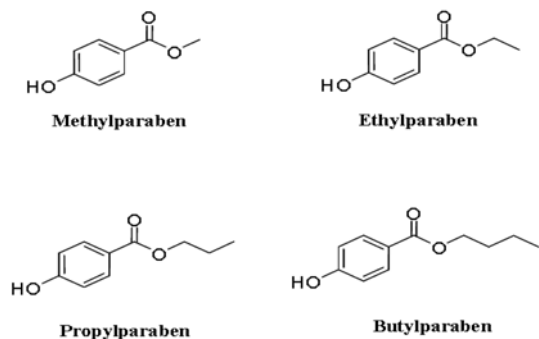


Fig. 1. Chemical structures of parabens.

Table 1. Retention times and characteristic ions of parabens

Compounds	MW	Retention time (min)	Quantitation ion (m/z)
Methylparaben	152	5.46	151
Ethylparaben	166	6.71	165
Propylparaben	180	8.41	179
Butylparaben	194	10.33	193

기화 온도는 350 °C이었으며, 이때 30 psi 분사압력으로 시료를 분무시키고 fragment voltage는 80 V를 적용하였다.

Capillary voltage는 3,500 V이었으며, 특징이온을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring (SIM)법을 사용하였다. 그리고 시료 주입방법은 autosampler를 이용하여 5 µL를 주입하여 분석하였다.

LC/ESI-MS에 사용된 표준물질의 머무름 시간 및 특성이온은 Table 1에 나타냈다.

2.3. 표준용액의 제조

LC/ESI-MS에 사용한 파라벤의 표준용액 제조는 구입한 표준품을 0.1 mg까지 무게를 달아 메탄올로 1000 µg/mL의 농도가 되도록 표준용액을 만들고, 이를 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL의 농도범위로 희석하여 검정곡선 작성에 사용하였으며 제조한 모든 표준용액들은 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2.4. 시료

화장품 시료는 국내에서 시판되고 있는 14종을 구입하여 사용하였으며, LC/ESI-MS로 분석하기 전 화장품 시료를 각각 0.5 g씩 취하여 5 mL 메탄올에 용해시킨 후 10 분간 초음파 처리 후 0.45 µm의 필터를 사용하여 여과한 다음 여액 5 µL를 주입하여 LC/ESI-MS로 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

검정곡선을 작성하기 위해 0.05-10 µg/mL의 농도범위로 희석하여 만든 파라벤 표준물질을 LC/ESI-MS로 분석하여 얻어진 상관 관계식을 Table 2에 나타내었다. Table 2에서와 같이 표준용액의 농도범위에서 r^2 값이 모두 0.9993 이상을 나타냄에 따라 직선성이 매우 좋고 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

3.2. LC/ESI-MS 분석

화장품 중에 함유된 파라벤을 검출하기 위하여 표준물질을 앞의 기율기 용리 조건에서 LC/ESI-MS의 negative mode로 분석한 이온크로마토그램 및 질량스펙트럼을 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 나타내었다.

Fig. 2는 표준물질에 대한 이온크로마토그램으로서 LC/ESI-MS의 negative scan mode를 이용하여 m/z

Table 2. Simple linear regression of standard calibration for the parabens

Compounds	Concentration range (µg/mL)	Regression eqn.	Correlation coefficient(r^2)
Methylparaben	0.05 ~ 10.0	$y = 153405x + 10663$	0.9996
Ethylparaben	0.05 ~ 10.0	$y = 209579x + 86445$	0.9995
Propylparaben	0.05 ~ 10.0	$y = 350351x + 30773$	0.9995
Butylparaben	0.05 ~ 10.0	$y = 491344x + 59695$	0.9993

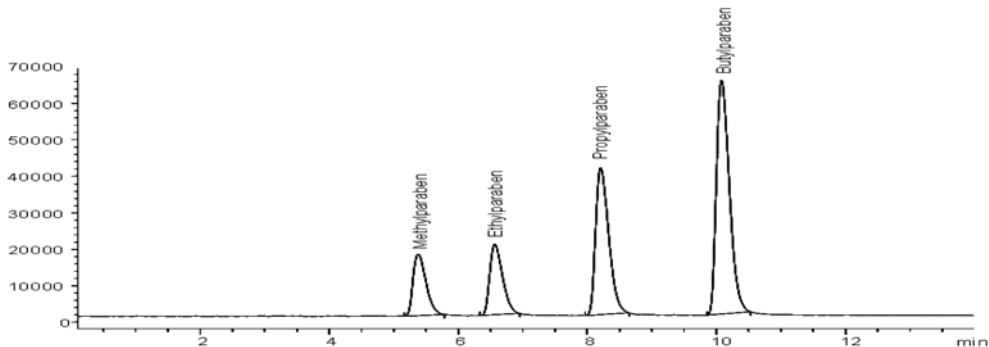


Fig. 2. Total ion chromatogram (TIC) of standard parabens obtained by LC/ESI-MS.

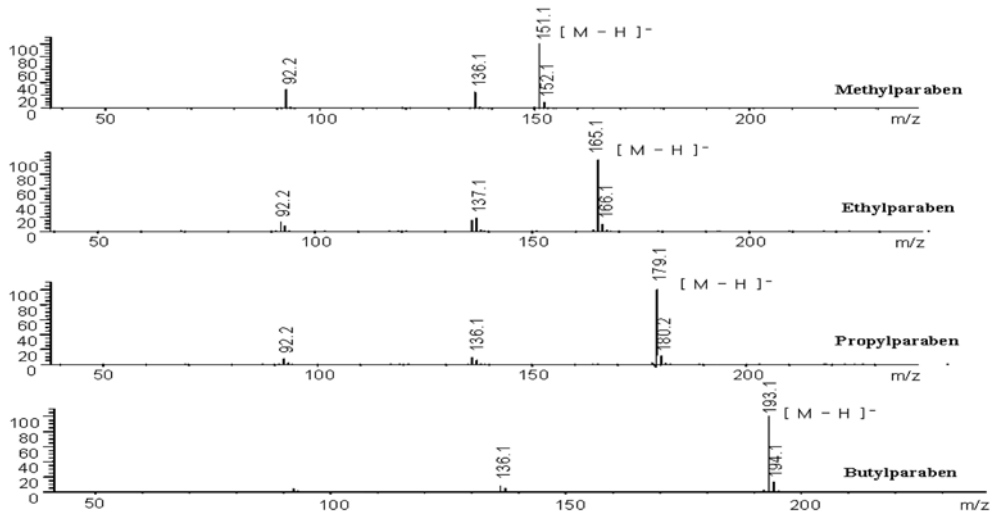


Fig. 3. Mass Spectra of parabens using LC/ESI-MS.

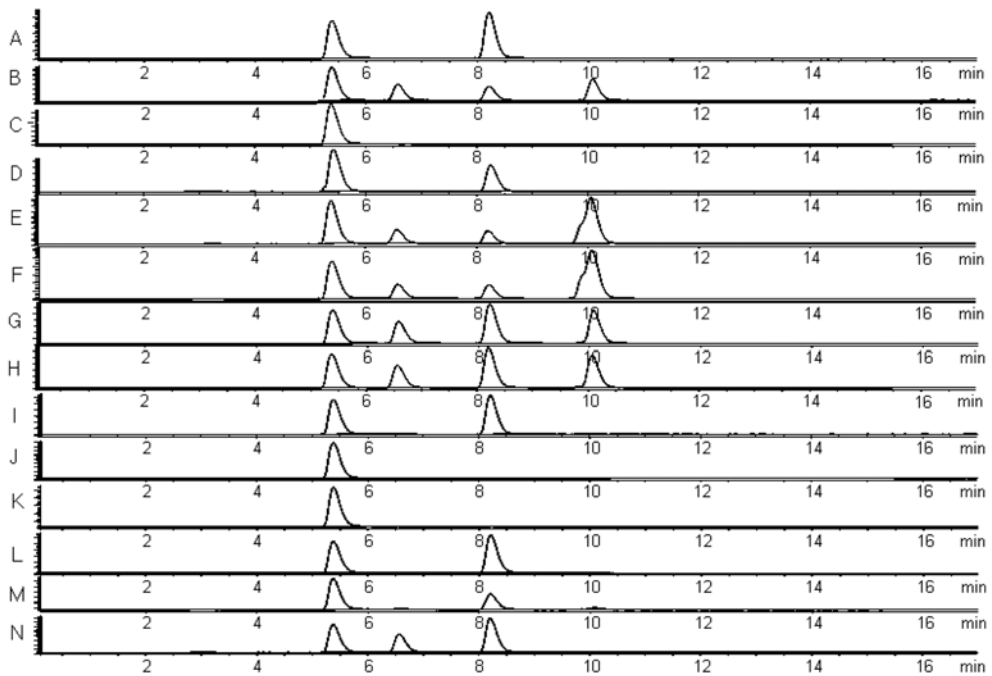


Fig. 4. SIM chromatograms of parabens in commercial cosmetics obtained by LC-ESI-MS.

100-600의 질량 범위에서 분석하여 얻어진 결과들이다. 이온크로마토그램에서 보는 바와 같이 표준물질들은 본 실험에서 사용한 Extend-C₁₈(150 mm × 4.6 mm i.d., 3.5 μm) 칼럼의 분리조건에 의하여 모두 12분 이내에 완전히 분리되어 나온 것을 알 수 있었다.

Fig. 3은 표준물질들의 질량스펙트럼을 나타낸 것으

로서, LC/ESI-MS의 negative mode에서 이동상으로 10 mM ammonium acetate 용액을 사용하였을 때 파라벤류들이 가지고 있는 수산화기 (-OH)는 deprotonation 되어 [M-H]⁻의 형태로 분자이온이 가장 크게 나타남으로써 이온화가 잘 일어난다는 것을 알 수 있었으며 각각 표준물질의 분자량에서 양성자 1개를 잃은 [M-

Table 3. Concentration ($\mu\text{g/g}$) of parabens in cosmetics

Samples	Mean ^a ±S.D.			
	Methylparaben	Ethylparaben	Propylparaben	Butylparaben
A	1625 ± 28.4	ND	607 ± 11.6	ND
B	455 ± 3.5	152 ± 5.7	56 ± 2.1	40 ± 2.1
C	1406 ± 18.7	ND	ND	ND
D	2257 ± 20.8	ND	555 ± 12.0	ND
E	1350 ± 15.8	293 ± 6.4	125 ± 3.2	506 ± 5.9
F	203 ± 4.7	47 ± 1.4	20 ± 0.8	87 ± 1.4
G	1920 ± 11.6	900 ± 11.6	845 ± 25.9	526 ± 7.8
H	1925 ± 11.1	935 ± 18.5	885 ± 25.6	528 ± 3.9
I	1770 ± 34.9	ND	760 ± 11.0	4.3 ± 0.2
J	1740 ± 26.0	ND	ND	2.6 ± 0.1
K	2170 ± 32.0	ND	ND	ND
L	2160 ± 16.0	ND	1080 ± 9.5	ND
M	888 ± 5.3	ND	120 ± 8.8	ND
N	1760 ± 39.1	835 ± 6.5	880 ± 1.1	ND

^aMean value from 5 measurements

HJ로 검출되어 각 화합물을 확인할 수 있었다.

Fig. 3의 질량스펙트럼에서 보여주듯 메틸파라벤의 질량은 152 Da 인데 [M-H]⁻ Da 만큼 질량이 감소하여 151 Da의 질량을 얻었으며 에틸파라벤, 프로필파라벤, 부틸파라벤등도 각각 165 Da, 179 Da, 193 Da 으로 탈양성자화 분자이온들이 질량스펙트럼에 나타났다.

이 결과는 LC/MS의 전자분무 이온화 방법 중 negative mode의 전형적인 스펙트럼으로 [M-H]⁻의 이온이 형성된 분자이온을 검출 하므로 복잡한 매질이 포함된 시료에도 불구하고 LC/ESI-MS의 높은 감도와 선택성이 좋아 유도체화나 전처리기가 필요 없이 바로 분석할 수 있어 분석시간을 획기적으로 단축할 수 있었고 이 분자이온을 이용하여 정성과 정량분석을 하였다.

3.3. 시료의 분석 결과

실제 시료인 14종의 화장품을 LC/ESI-MS로 분석한 SIM 크로마토그램을 Fig. 4에 나타내었고 정량 결과는 Table 3에 나타내었다.

Fig. 4에서 보논바와 같이 전체시료의 SIM 크로마토그램에서 C, J, K는 메틸파라벤 한 성분만 들어 있었으며 이때 농도는 1406-2170 $\mu\text{g/g}$ 이었고 A, D, I, L, M등은 메틸과 프로필파라벤의 두 성분이 검출되었으며 검출된 전체 양은 2232-3240 $\mu\text{g/g}$ 의 농도를 나타내었으며 B, E, F, G, H, N등은 그 이상의 파라벤이 들어있음을 알 수 있었고 이 때 농도는 703-3475 $\mu\text{g/g}$ 이었다.

특히 B와 F시료는 메틸, 에틸, 프로필, 부틸파라벤 등이 모두 들어 있었지만 전체 파라벤의 함량이 703 $\mu\text{g/g}$ 과 357 $\mu\text{g/g}$ 으로 적은 양이 검출되었으며 G와 H 처럼 많게는 4191 $\mu\text{g/g}$ 과 4273 $\mu\text{g/g}$ 까지 들어 있음을 확인할 수 있었다.

각각의 화장품에 있는 파라벤의 양은 시료에 따라 약간씩의 차이는 나지만 전체 14종의 화장품 중 메틸 파라벤의 함량이 203-2257 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 많이 사용되고 있었으며 에틸파라벤은 47-935 $\mu\text{g/g}$ 이었고 프로필파라벤은 20-1080 $\mu\text{g/g}$, 부틸파라벤은 2.6-528 $\mu\text{g/g}$ 으로 검출된 결과로 보아 화장품 제조시 메틸, 프로필, 에틸, 부틸파라벤 순으로 많이 사용되고 있음을 알 수 있었다.

이로부터 14종의 화장품에서 검출된 전체 파라벤의 양은 모든 시료에서 0.8%가 넘지 않는 것을 알 수 있었으며 이는 유럽연합에서 규정한 화장품에 사용되는 파라벤의 허용 농도가 단일 파라벤을 사용할 경우 0.4% 이하이고, 몇 가지 파라벤을 혼합하여 사용할 경우에는 전체 파라벤의 농도가 0.8%를 넘지 않도록 하고 있는 것과 비교해 보면 규제치보다 적은 양이 사용되고 있음을 알 수 있었다.

4. 결 론

화장품에 존재하는 파라벤을 분석하기 위한 방법으로 지금까지는 HPLC나 유도체화 후 GC 및 GC/MS

로 분석하는 방법이 대부분이었으나 이러한 방법들은 다양하고 많은 매질의 영향으로 인하여 물질의 확인이 까다롭고 분석시간이 많이 소요되며 GC 및 GC/MS의 사용시 유도체화를 하지 않으면 감도가 낮아 분석이 어려운 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 시료를 메탄올에 직접 녹인 후 바로 LC/ESI-MS를 이용하여 분석하므로 전처리가 필요 없는 새로운 분석 방법이며 분석 결과 LC/ESI-MS의 정량범위는 0.05-10 µg/mL 농도범위에서 검정곡선이 직선성($r^2=0.9993$)을 나타냄으로써 화장품뿐만 아니라 크로마토그래피를 이용한 복잡한 매질로 구성된 시료로부터 메틸, 에틸, 프로필, 부틸파라벤 등을 정량하기 위해서는 기존의 방법들보다 간편하고 분석시간을 획기적으로 줄일 수 있는 좋은 방법이 될 수 있음을 보여주었다.

참고문헌

1. S. H. Kang and H. Kim, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **15**, 1359-1364(1997).
2. M. R. Lee, C. Y. Lin, Z. G. Li and T. F. Tsai, *J. Chromatogr. A* **1120**, 244-251(2006).
3. D. M. Kreuz, A. L. Howard and D. Ip, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 725-735(1999).
4. C. P. Neidig and H. Burrell, *Drug Cosmet. Ind.* **54**, 408-481(1944).
5. E. Schopf and A. Baumgartner, *J. Appl. Cosmetol.* **8**, 39-49(1990).
6. E. J. Routledge, J. Parker, J. Odum, J. Ashby and J. P. Sumpter, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **153**, 12-19(1998).
7. S. Oishi, *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1807-1813(2002).
8. F. D. Croo, J. D. Schutter, W. Van den Bossche and P. D. Moerloose, *Chromatographia*, **18**, 260-264(1984).
9. H. J. Lin and Y. M. Choong, *J. Food Drug. Anal.* **7**, 291-299(1999).
10. H. J. Lin, M. L. Wang, C. W. Chen, B. S. Hwang, M. H. Lee and Y. M. Choong, *J. Food Drug. Anal.* **8**, 180-186(2000).
11. M. González, M. Gallego and M. Valcárcel, *J. Chromatogr. A* **848**, 529-536(1999).
12. Y. Maeda, M. Yamamoto, K. Owada, S. Sato, T. Masui, H. Nakazawa and M. Fujita, *J. Chromatogr.* **410**, 413-418(1987).
13. F. O. Serrano, I. S. Lopez and G. N. Revilla, *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 709-717(1991).
14. C. Mannucci, J. Bertini, A. Cocchini, A. Perico, F. Salvagnini and A. Triolo, *J. Liq. Chromatogr.* **15**, 327-335(1992).
15. M. A. Quarry, D.S. Sebastian and R. C. Williams, *Chromatographia* **47**, 515-522(1998).
16. G. Burini, *J. Chromatogr. A* **664**, 213-219(1994).
17. Y. Q. Guan, Q. C. Chu, L. Fu and J. N. Ye, *J. Chromatogr. A* **1074**, 201-204(2005).
18. Y. J. Heo and K. J. Lee, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **17**, 1371-1379(1998).
19. S. P. Wang and C. L. Chang, *Anal. Chim. Acta* **377**, 85-93(1998).
20. Y. H. Lin, S. S. Chou, F. Sheu and Y. T. Shgu, *J. Chromatogr. Sci.* **38**, 345-352(2000).
21. R. Driouich, T. Takayanagi, M. Oshima and S. Motozumi, *J. Chromatogr. A* **903**, 271-278(2000).