

Simultaneous HPLC determination of multiple compounds in a cosmetic lotion

Baeksun Ahn, ChulHee Jung, HoSoon Lim, Hoosub Lee, SangHoon Lee

Hanbul Cosmetics Co. Ltd. Q/C Team #72-7, Youngsung-Ri Samsung-Myun

Umsung-Kun Choong-Buk 369-834, KOREA

Abstract

A high-performance liquid chromatographic method for the simultaneous determination of arbutine, a mixture of methyl, ethyl, propyl, butyl parabens dissolved in methanol and Glablidine(Oil Soluble Licorice), was studied by using a ODS C18 column and a methanol gradient at 254 and 276 nm. Calibration curves were found to be linear in the 0.5-10 $\mu\text{g/ml}$ range(compounds arbutine, glablidin) and 0.1-20 $\mu\text{g/ml}$ (compounds methylparaben,

ethylparaben, propylparaben, butylparaben). 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 cosmetic lotion. The precision of this method, calculated as the relative standard deviation(RSD) of the recoveries(0.28-2.55%) was excellent for all compounds.

요 약

고속액체크로마토그래피 방법을 사용하여 동시에 arbutin, 메탄올에 녹인 methyl, ethyl, propyl, butyl parben과 glablidine(유용성감초추출물)을 파장 254와 276 nm 에서 Gradient methanol로 octadecyl column 을 사용하여 측정하였다. arbutin와 glablidine 농도 0.5-10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 파라벤류는 0.1-20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 검량선이 직선으로 작성되었다. 검량이 직선으로 나타나 정량분석을 할 수 있다는 것을 알 수 있었다. 샘플 전처리가 크로마토그래피로 측정하기에 좋은 방법이란 것을 판정하기 위하여 일반로션을 사용하여 판정하였다. 이 방법의 정확도는 모든 측정물질(arbutin, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, glablidine)의 회수율 상대표준편차(RSD)가(0.28-2.55%) 나타나 신뢰성 있는 결과를 보였다.

1. Introduction

최근에 화장품산업에서 다양한 규제가 생기고 있다. 그 중 현재 시행되고 있는 제조물 책임법과 시행계획예정인 화장품 전성분표시제는 새로운 변화라고 할 수 있다. 화장품은 다른 화학특성을 가진 다른 화학혼합물의 복합체이다. 그러므로, 이러한 변화에 대처하는 것은 새로운 분석방법을 꾸준히 연구하고 시중 유통되는 화장품에 사용되는 원료를 정량-정성 검출하는 것이 가장 확실한 방안으로 생각된다.

실제로, 유액화장품에 대하여는 미백에 도움을 주는 비타민 C와 그 유도체, 방부제인 파라벤류에 대하여는 다양하게 연구가 되고 있다.[1,2]

유액화장품에서 미백제와 같은 방부제류를 동시에 검출하고 정량하는 분석문헌은 아직 발표된적이 없다. paraben 혼합 방부제는 항상 ODS 컬럼에서 이루어 졌다. 물질의 극성에 특징으로 너무 일찍 검출되어 octylsilica와 aminopropyl column에서 주로 분석되어졌다.[3,4] 반대로 arbutin은 ODS고정상에서 초기에 검출되어진다.

이번실험에서 우리는 ODS 컬럼을 사용하여 phospho- 버퍼-메탄올 이동상에서 Gradient 이동상시스템에서 다중의 여러 성분을 동시에 분석할 수 있었다. UV-PDA 검출기를 사용하므로 해서 같은 retention time에서 검출되어지는 혼합물중의 여러물질의 복잡한 문제를 극복하였고 동시에 여러 파장에서 측정할 수 있었다.

이 크로마토그래피방법은 일반제품의 품질관리나 자주 행해지는 분석실험에 성공적으로 활용될 수 있을 것이다. 우리는 물-유기용매 혼합의 샘플을 끓히는 것을 기본으로 하는 전처리 방법을 사용하였다.[4,5]

2. Experimental

2.1. Reagents and standards

arbutin(I), methyl(Ⅱ), ethyl(Ⅲ), propyl(Ⅳ) 및 butylparaben(V) 은 Sigma-Aldrich부터 구입하였다. 모두 사용한 시약을 분석시약급을 사용하였다. glablidine(VI)은 Maruzen 96.0 % 이상을 사용하였다. methanol은 HPLC등급을 사용하였고, 이동상 및 용매는 0.45 μm membran에서 여과하고 이동상 용존 기체는 초음파로 제거하였다.

2.2. Instrumentation

HPLC는 풀 옵션 Waters HPLC(USA)로, 510 Pump, Autosample 717 plus 25 μl 루프, Photo diode array UV multi-wavelength detector 960 을 사용하였다. 크로마토그래피의 데이터는 Millennium 32 Software를 사용하여 계산하였다. Column은 Symmetry C18 5.0 μm , 250x4.6 mm id(Waters) 스테인스틸을 사용하였다.

2.3. Chromatographic

이동상은 초기에 methanol :monobasic sodium phosphate(pH 3.5;0.025M)(60:40, v/v)의 비율로하고, 다음으로, 6분간 메탄올이 80 %가되게 이동상을 변화하였다. 이 비율을 10분간

유지하고, 4분안에 초기 이동상 비율로 다시 환원하였다. 유속은 1.0 ml/min 으로 하였다.

검출은 254 과 276 nm의 상온에서 하였다.

2.4. Calibration curves

물과 메탄올혼합에서 5개의 혼합물을 무게피로 각각을 용해하여 표준용액을 표 2에 있는 농도 범위에서 제조하였다. 검량선은 물질에 대하여 y축은 피크의 면적으로하고, x축은 농도에 대하여 데이터의 분석횟수(n=5)로 각각의 물질에 대하여 기울기를 위한 값을 정하고, 각 검량선에 대하여 상수를 정하여 검량선의 수식을 작성하였다(Table 2). 검량선은 일반제품에 대하여 5개의 샘플을 작성하고 각 물질의 정량을 위하여 사용하였다.

2.5. Sample preparation

제품 약 1g을 정밀하게 달아 1:10으로 Tetrahydrofurane-phosphate buffer(pH 3.5;0.025M)(3:7, v/v) 마개달린 튜브에서 희석하였다. 이것을 볼텍스에서 교반후 약간 따뜻한 수욕조에서 균질하게 될 때까지 혼합한다. 다시 0.45 μ m 실진지 여과기를 사용하여 여과한다. 이 샘플을 농도에 따라 희석하여 크로마토그래피의 샘플로 사용한다.

3. Results and discussion

3.1. Validation of the method

현재 크로마토그래피의 목표는 매우 다른 성질로 복잡하게 혼합되어 있는 I-VI의 물질을 분리하는데 있다. arbutin은 극성이고, 파라벤류는 중간극성으로 다른 컬럼들을 사용하여 분석되어 졌다. 여기서, 분석하고자하는 물질들에 대하여 methanol gradient로 ODS 컬럼을 사용하여 실험하였다. Fig. 1에 I-VI의 표준혼합물에 대한 크로마토그래피를 나타내었다.

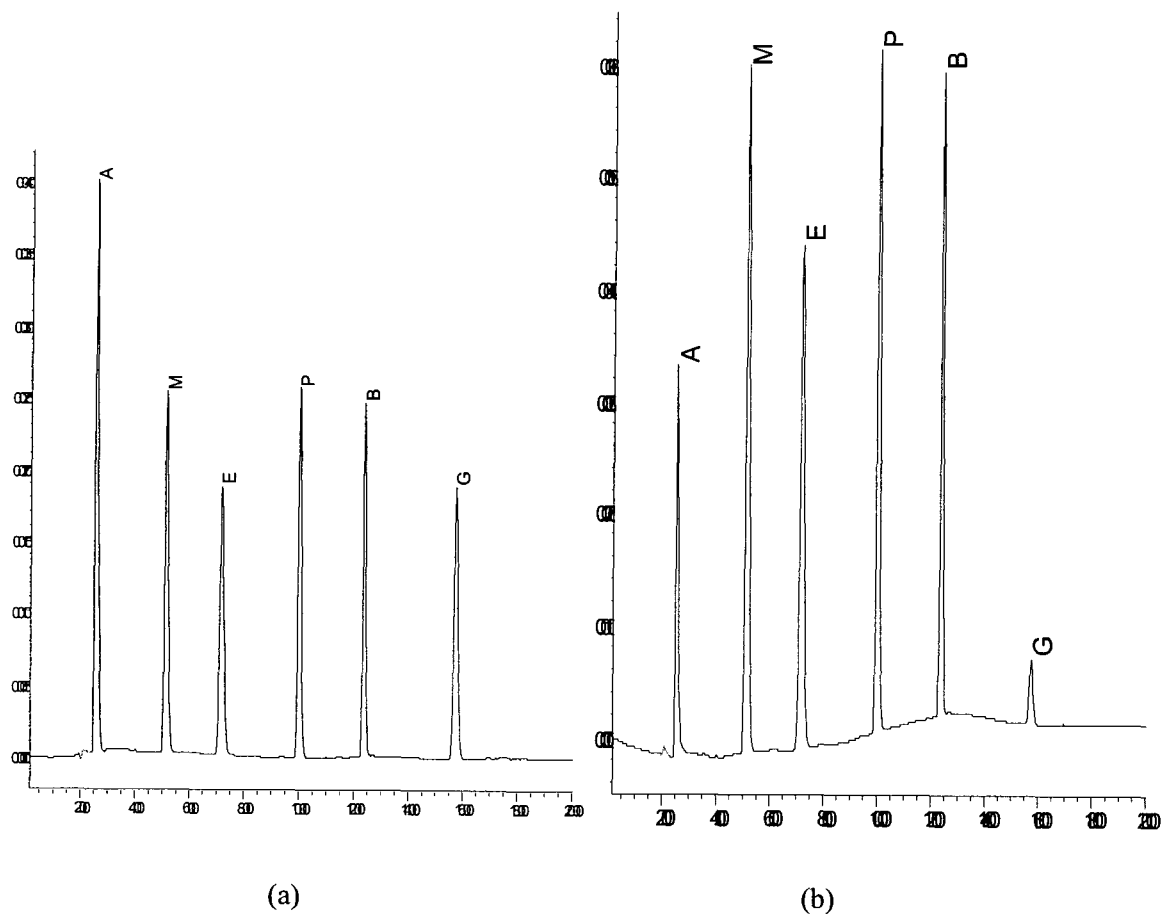


Fig. 1. Chromatograms of standard mixture at: (a) 254 nm; and (b) 276 nm.

실험에서 어려운 점은 혼합 파라벤류의 분리와 짧은 retention time을 나타내는 arbutin의 용출을 나타내는 것이었다. 실제로, methanol gradient는 방부제의 용출은 약간 느리지만 좋은 분리하기 위한 방법이다. 그러므로, 짧은 시간 컬럼에 방부제가 머무르고 분리의 좋지 않은 효과를 제거하는 좋은 분리조건으로 생각된다.

Table 1

Retention times(min) of compounds I - V

arbutin	2.54
methylparaben	5.14
ethylparaben	7.17
propylparaben	10.02
butylparaben	12.38
<u>glablidine</u>	<u>15.74</u>

arbutin은 역상컬럼에서 retention time이 짧아 용매와 거의 동시에 용출되는 현상이 있는데 여기서는 어느 정도 메탄올과 Buffer의 혼합의 조절로 극복할 수 있었다. 우리는 방부제와 그 외의 물질 정량을 위하여 UV-PDA를 사용하여 물질에 따라 선택적으로 파장을 조절하여 정량을 할 수 있었다. Fig. 1(a)는 254 nm에서 크로마토그래피의 검출감도이고, Fig. 1(b)는 276 nm에서 검출 감도이다.

정확-정밀한 선형 validation은 다음과 같은 방법을 사용하였다. Table 2.에 농도에 따른 선형 검량선을 표시하였다. 이 농도범위에서 다음의 I-VI의 물질에 대하여 제품내에서도 측정하였다(Table 3). 정확도는 0.9991에서 1.0000이고(n=5), 이 물질들의 같은 농도범위에서 상대표준표차(RSD)를 계산하였다. RSD는 0.9974%에서 1.0106% 이었다. 계산식은 I-VI의 물질에 대한 계산식에 의거하여 계산하였다. 분석되어진 물질의 회수율은 98.9%-100.2% 이었다.

Table 2

Validation data(n = 5)

<u>Compound</u>	<u>Conc. range</u>	<u>Cal. curves</u>	<u>Corr.Coeff</u>	<u>Recovery avg.%</u>	<u>Recovery RSD%</u>
arbutin	0.5-10 $\mu\text{g/ml}$	$Y=19977X+2176$	0.9997	100.2	0.9974
methylparaben	0.1-10 $\mu\text{g/ml}$	$Y=21677X+3977$	0.9993	99.6	1.0026
ethylparaben	0.1-10 $\mu\text{g/ml}$	$Y=51549X-3379$	0.9991	99.4	1.0043
propylparaben	0.5-20 $\mu\text{g/ml}$	$Y=16335X-164$	1.0000	99.8	1.0020
butylparaben	0.5-20 $\mu\text{g/ml}$	$Y=31091X-11093$	0.9997	98.9	1.0106
glablidine	0.5-10 $\mu\text{g/ml}$	$Y=3278X-432$	0.9999	99.7	1.0029

Y, 피크면적; X, 농도

Table 3

Recoveries% of compounds I -VI in commercial batches

	<u>arbutin</u>	<u>methylparaben</u>	<u>ethylparaben</u>	<u>propylparaben</u>	<u>butylparaben</u>	<u>glablidine</u>
	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml	0.5 μ g/ml
1	100.62	99.64	99.20	99.12	94.71	102.31
2	98.94	99.06	99.71	99.42	94.24	97.85
3	101.21	99.65	98.84	99.93	93.38	98.84
4	98.78	99.12	98.90	99.86	93.76	100.12
5	99.92	99.58	97.62	99.21	93.76	97.28
6	100.61	99.63	99.98	99.34	94.15	103.70
mean	100.01	99.45	99.04	99.48	94.35	100.02
RSD	0.98	0.28	0.83	0.34	0.80	2.55
CV	0.98	0.28	0.84	0.34	0.84	2.55

CV; 분산계수, RSD; 상대표준편차

3.2. Application to quality control

validation 방법은 일반제품에서 전처리방법의 재현성과 I-VI 물질들의 농도를 증명하기 위한 방법이다. Fig. 2에 제품에 전처리한 후 각각의 물질에 대하여 254nm와 276nm에서 측정된 I-VI 물질의 크로마토그램을 보여주고 있다. 제품내에서 물, 지방, 계면활성제는 정량하지 않고, 단지 방부제와 활성성분을 검출하였으며, 제품의 내에서 정량하는데는 많은 영향을 끼치지 않았다.

Table 3에 I-VI의 일반제품에서 I-VI 혼합물들의 회수율 나타내었다. 이방법의 정밀도는 표준편차에서 0.28-2.55로 모든 물질들에서 좋은 결과를 얻었다. 그러나 butylparaben에서는 93.38%와 94.71%의 범위를 나타내었다.

비록, 실험에서 정밀도는 만족하지만 이론적으로 I-VI의 물질에 대하여 동시에 일반제품에서 정확한 양을 알아내기 위해서는 보다 개선된 시료전처리가 필요하다는 것을 알수가 있었다.

우리는 시료 전처리에서 많은 변수가 있다는 것을 알고 있다. 버퍼구성에서 이온강도; 이 동상의 변화로, tetrahydrofurane, methanol, ethylic ether 및 그것들에 함량구성, 그러나, 우리는 모든 I-VI의 물질에 대한 좋은 혼합용매는 알 수가 없었다.

전처리시스템을 개선하는 이유는 일반제품을 측정시 컬럼의 손상을 가져와 수명을 짧게 한다. 실제로 이 실험의 일반제품측정시 약 100번 정도의 분석을 할 수 있었다. 우리는 이러한 영향을 줄이기 위하여 가드컬럼을 사용할 경우 정확도와 정밀도가 증가되고 수명을 연장할 수 있었다.

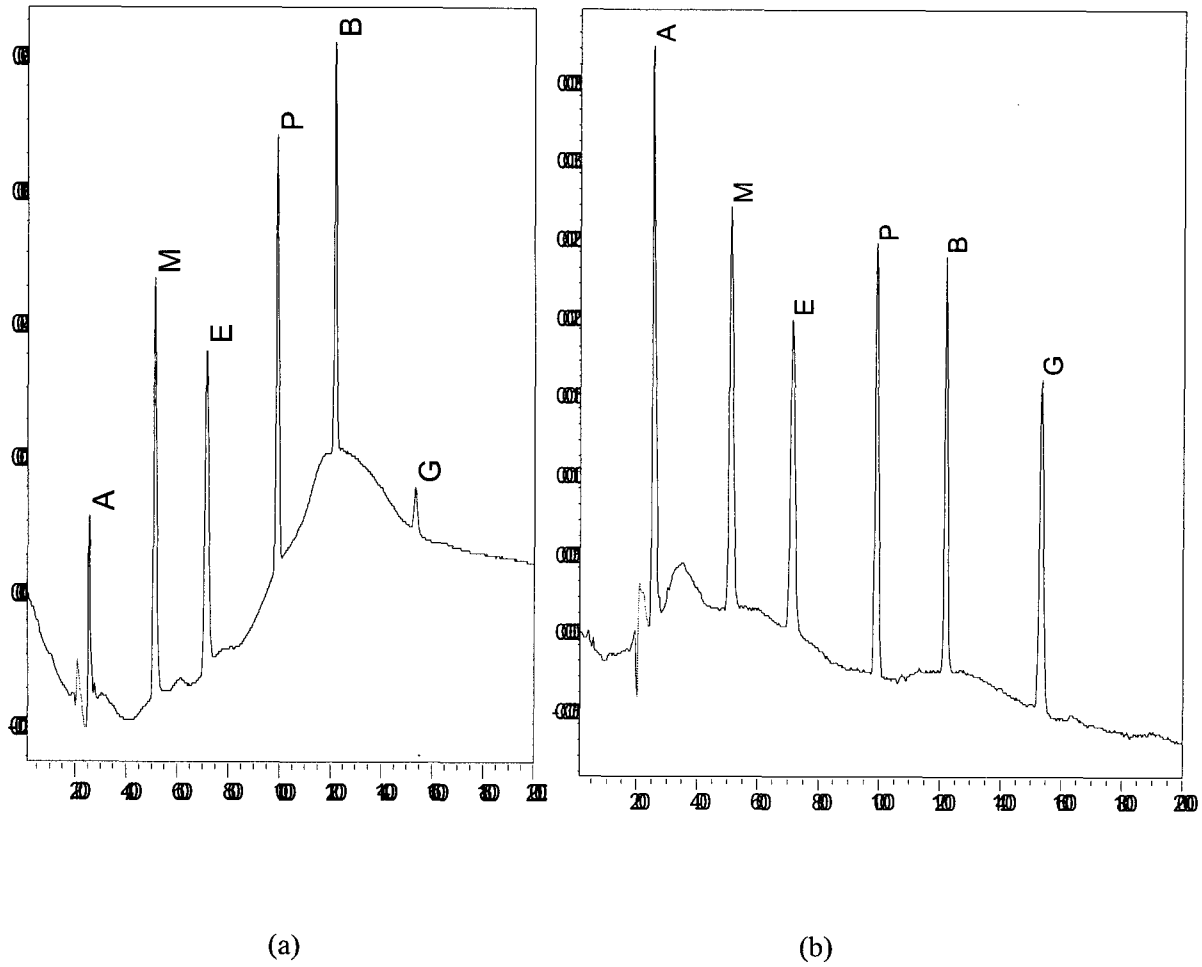


Fig. 2. Chromatogram of mixture extracted from commercial lotion at:

(a) 254 nm; and (b) 276 nm.

4. Conclusions

ODS column을 사용하여 I-VI의 혼합물질을 분리 분석하였다. 실제 극성과 비극성의 물질을 이 조건에서 서로간에 간섭을 줄여 역상컬럼에서 잘 분리가 되었다.

짧은 머무름시간을 극복하였고, I-VI개의 혼합물질을 간단한 전처리 방법을 사용하여 메탄을 gradient로 간단하게 일반제품에서 분석을 할 수 있었다. 제품에서 butylparaben을 제외하고 회수율이 만족하였으며, 모든 물질의 정확한 분석을 위해서는 시료전처리의 개선이 필요하였다.

References

- [1] G. Proserpio, H. Sedghi Zadeh, *Cosmet. News* 65(1989) 111-114.
- [2] H. Takashima, H. Nomura, Y. Imai, H. Mina, *Am. Perfum. Cosmet.* 86(1971) 29-32.
- [3] A. Bettero, A. Semenzato, G. Aversa, C. A. Benassi, *Chim. Oggi* 11(1985) 29-32
- [4] A. Semenzato, R. Austria, C. Dail'Aglio, A. Bettero, *J. Chromatogr. A* 705(1995) 385-389
- [5] A. Bettero, B. Casetta, F. Galiano, E. Ragazzi, C.A. Benassi, *Fresenius' Z. Anal. Chem.* 318(1984)525-531.