

HPLC에 의한 연질 캡셀제중 Paraben류의 분석

약품화학과

黃仁淑·吳世宗·尹源庸

Analysis on the Contents of Parabens in Soft Capsule Preparations by HPLC

Division of Pharmaceutical Chemistry

In Sook Hwang, Sea Jong Oh and Won Yong Yoon

= Abstract =

This study was performed to analyze the contents of p-hydroxybenzoic acid esters(parabens) in soft capsules. The experimental samples included 10 kinds of soft capsule preparations collected in domestic area. A rapid and simple method for simultaneous determination was based on the HPLC separation of the components on a μ -Bondapak C₁₈ column with 60% methanol as a mobile phase at 254nm. Four kinds of parabens were successfully separated within 15 minutes and the recoveries were more than 95%. The results were as follows.

1. It was good linearity($r=0.999$) in 10~100 ppm of parabens(methyl, ethyl, propyl and butyl)
2. Most of cases, simultaneous use of methyl and propyl parabens was detected.

緒 論

연질 캡셀 형태로 되어있는 대부분의 제제는 방부제 등을 함유하고 있으며, 주로 paraben류가 많이 쓰인다. 이 paraben류는 Colorimetry, UV Spectrometry, Thin-Layer Chromatography, Gas-Liquid Chromatography 그리고 High Performance Liquid Chromatography¹⁻³⁾ 등에 의한 수많은 분석이 보고되었다. 그런데 이들 연질 캡셀제에는 부형제 등이 많아 방부제들을 분석하기 전 대개는 추출조작을 필요로하며 수증기 증류⁴⁾나 ether추출⁵⁾ 등 불편한 전처리 조작을 거쳐 HPLC나 GC를 이용한 분석방법이 사용되어 왔다. 현재 보존제에 대한 공정시험법으로는 국립보건원 고시에 GC법이 규정되어 있으나 그 전처리 조작이 복잡하고 시간도 많이 걸린다. 이

에 저자 등은 연질 캡셀제중 방부제로 많이 사용되는 paraben류를 HPLC를 이용하여 신속 정확히 분석하므로서 의약품 품질관리에 적정을 기하고자 본 연구를 시도하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

시중에서 유통되고 있는 연질 캡셀제 10종을 사용하였다.

2. 試 藥

methyl, ethyl, propyl, butyl paraben 표준품 등은 국립보건원으로부터 분양 받아 사용하였고, methanol은(HPLC용, Labguard사)것을, 증류수는 reverse os-

mosis/tank system과 ultrapure water system(Barstead사)을 통과시킨 정제수를 사용하였다.

3. 機器

High performance liquid chromatograph(waters), Ultrasonic bath(Branson 8210), Millipore (waters)를 이용하였다.

4. 實驗方法

1) 標準液의 調製

methyl, ethyl, propyl, butyl paraben을 각각

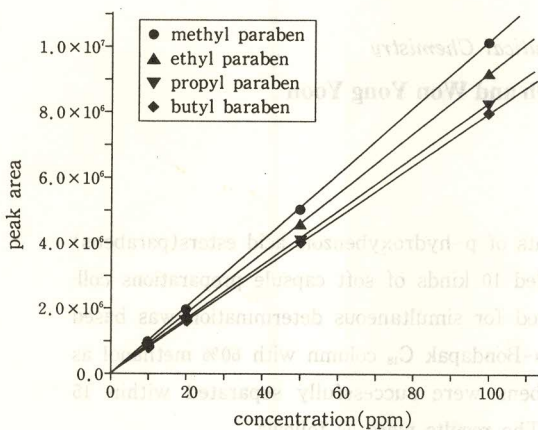
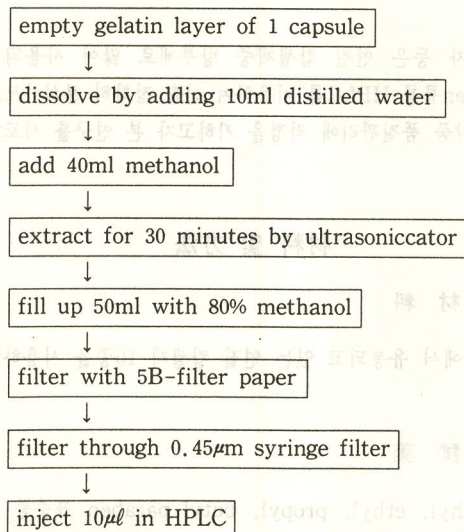


Fig. 1. The calibration curve of methyl, ethyl, propyl, butyl parabens.



Scheme 1. Procedure of extraction method(gelatin layer).

51.5mg, 51.9mg, 50.9mg, 53.6mg을 50ml 용량 플라스크에 넣고 methanol에 녹여 포선까지 채워 stock solution으로 만들었다.

2) 檢量線 作成

위의 stock solution을 각각 1.0, 2.0, 5.0, 10.0ml

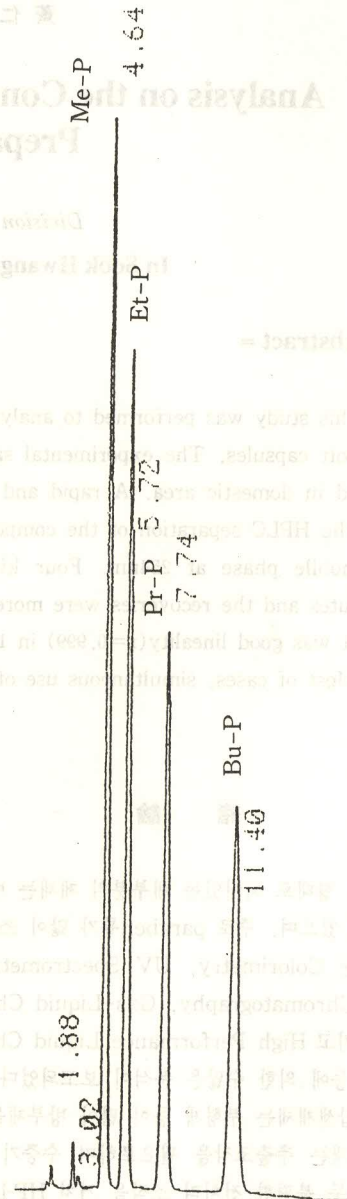


Fig. 2. HPLC Chromatogram of mixed standard parabens.

Me-P : methyl paraben Et-P : ethyl paraben
Pr-P : propyl paraben Bu-P : butyl paraben

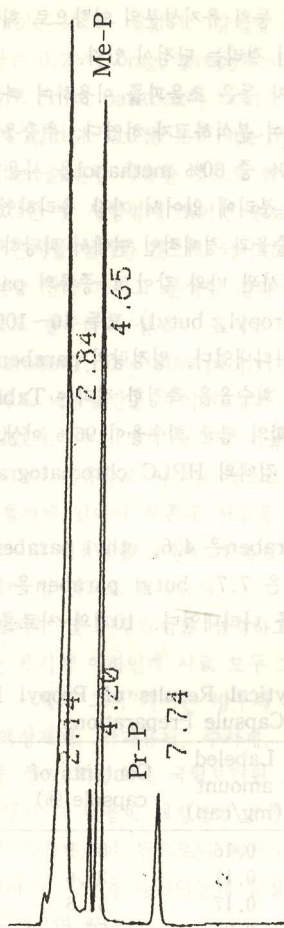
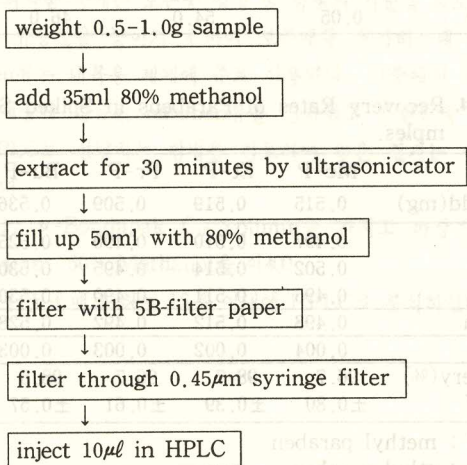


Fig. 3. HPLC Chromatogram of gelatin layer.
 Me-P : methyl paraben Et-P : ethyl paraben
 Pr-P : proptyl paraben Bu-P : butyl paraben



Scheme 2. Procedure of extraction method(contents of capsule).

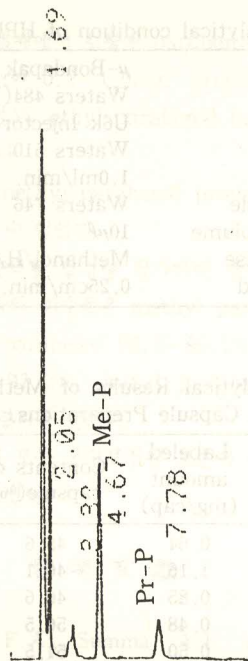


Fig. 4. HPLC Chromatogram of contents of capsule.

Me-P : methyl paraben Et-P : ethyl paraben
 Pr-P : propyl paraben Bu-P : butyl paraben

씩 취하여 100ml 용량 플라스크에 가한 후 methanol로 표선까지 채웠다. 이 들은 각각 약 10, 20, 50, 100 ppm의 농도를 나타내며 이들 용액 10 μ l씩을 HPLC system에 주입하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다(Fig. 1).

3) 檢液의 調製

(1) 젤라틴층 : 각각의 검체 1캡셀을 내용물을 완전히 제거한후 50ml 용량 플라스크에 넣고 10ml 증류수를 가하여 빈 캡셀을 완전히 녹이고 40ml methanol을 가하여 Ultrasonic bath에서 30분간 sonication하여 추출하였다. 80% methanol로 표선까지 채운다음 5B-filter paper로 여과하고 0.45 μ m syringe filter를 통과시킨 다음 검액으로 하였다(Fig. 3).

(2) 내용물 : 검체 일정량(약 1.0g)을 취하여 그 무게를 정확히 측정하여 50ml 용량 플라스크에 넣고 80% methanol 35ml를 넣어 Ultrasonic bath에서 30분간 sonication하여 추출하였다. 80% methanol로 표선까지 채운다음 5B-filter paper로 여과하고 0.45 μ m syringe filter를 통과시킨 다음 검액으로 하였다(Fig. 4).

Table 1. Analytical condition of HPLC.

Column	μ -Bondapak C ₁₈
Detector	Waters 484(UV 254nm)
Injector	U6k Injector
Pump	Waters 510
Flow rate	1.0ml/min.
Data module	Waters 746
Injection volume	10 μ l
Mobile phase	Methanol/H ₂ O(60/40)
Chart speed	0.25cm/min.

Table 2. Analytical Results of Methyl Parabens in Soft Capsule Preparations.

Sample	Labeled amount (mg/cap)	Contents of capsule(%)	Gelatin (%)
1	0.64	45.6	54.4
2	1.16	46.1	53.9
3	0.85	46.6	53.4
4	0.48	56.5	43.5
5	0.50	51.5	48.5
6	0.90	20.3	79.7
7	0.48	61.6	38.4
8	0.66	60.8	39.2
9	0.28	47.1	52.9
10	0.48	52.6	47.4

4) 回收率 測定

일정량의 methyl, ethyl, propyl, butyl paraben 표준원액을 일정량의 시료에 가한후 검액의 조제와 같은 방법으로 추출하여 회수율을 측정하였다(Table 2).

5) 定 量

상기 방법에 따라 조제된 표준액 및 검액을 Table 1의 조건에 따라 각 시료중에 함유된 각각의 paraben의 양을 HPLC로 정량하였다. Fig. 2, 3, 4는 HPLC로부터 얻은 표준액 및 검액의 chromatogram이다.

結果 및 考察

의약품 등에 쓰이는 보존제에는 여러가지 종류가 있으며 미생물의 증식에 의해서 일어나는 부패나 변패를 방지하기 위하여 사용되는데 내복제제인 경우 1일 허용총량은 paraben류는 10mg/kg 이하이다.⁴⁾ 또한 그 분석 방법으로는 수증기증류법⁵⁾이나 용매추출법⁶⁾이 많이 이용되어 왔으나, 수증기증류법은 증류, 추출 농축 등에 시간이 많이 걸리고 용매추출법은 포화식염수, ether, 황산 등을 사용해서 추출하는 경우 연질 캡셀제의 부형제로 많이 쓰이는

콩기름, 레시틴 등의 유지성분의 영향으로 회수율이 저하되고 시간이 많이 걸리는 단점이 있다.

이에 본 저자 등은 초음파를 이용하여 빠르고 간편하게 시료를 추출하여 분석하고자 하였다. 추출용매는 20, 40, 60, 80, 100% 중 80% methanol을 사용할때 추출율이 나, 피이크의 분리에 있어서 가장 유리하였고, 추출시간은 30분이 추출율과 경제적인 면에서 적당하였다.

Fig. 1에 제시된 바와 같이 4 종류의 paraben(methyl, ethyl, propyl, butyl) 모두 10~100 ppm까지 양호한 직선을 나타내었다. 일정량의 paraben 회석액을 시료에 첨가하여 회수율을 측정한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 3회의 평균 회수율이 96% 이상으로 양호하였다. 표준액과 검액의 HPLC chromatogram은 Fig. 2, 3, 4와 같다.

methyl paraben은 4.6, ethyl paraben은 5.7 propyl paraben은 7.7, butyl paraben은 11.4분대에서 양호한 peak를 나타내었다. 10개의 시료를 가지고 실험

Table 3. Analytical Results of Propyl Parabens in Soft Capsule Preparations.

Sample	Labeled amount (mg/cap)	Contents of capsule(%)	Gelatin (%)
1	0.16	58.1	41.9
2	0.11	22.6	77.4
3	0.17	51.8	48.2
4	0.05	56.4	43.6
5	0.25	60.5	39.5
6	0.18	52.3	47.7
7	0.05	100.0	0.0
8	0.14	31.6	68.4
9	0.07	31.0	69.0
10	0.05	54.0	46.0

Table 4. Recovery Rates of Parabens in Spiked Samples.

	Me-P	Et-P	Pr-P	Bu-P
add(mg)	0.515	0.519	0.509	0.536
1	0.497	0.510	0.490	0.525
2	0.502	0.514	0.495	0.530
3	0.495	0.511	0.490	0.530
mean	0.498	0.512	0.492	0.528
S. D.	0.004	0.002	0.003	0.003
recovery(%)	96.7	98.7	96.7	98.5
\pm C. V	\pm 0.80	\pm 0.39	\pm 0.61	\pm 0.57

Me-P : methyl paraben

Et-P : ethyl paraben

Pr-P : propyl paraben

Bu-P : butyl paraben

한 결과는 Table 2, 3과 같았다. 캡셀당 methyl paraben의 함유량은 0.2~1.0mg, propyl paraben은 0.03~0.2mg이었고 ethyl paraben과 butyl paraben은 한 건도 검출되지 않았다. 10건 모두 methyl paraben과 propyl paraben을 혼합 사용한 것으로 밝혀졌다.

각 검체의 기준 및 시험법에 쓰여진 원료약품 분량에는 캡셀기체에 보존제를 첨가한 것으로 되어있으나, 내용물을 제거한 젤라틴층 만을 가지고 분석한 결과 검출된양이 96%의 회수율에도 불구하고 실제로 표시된 양의 40%~80%(methyl paraben), 0%~80%(propyl paraben)정도였다. 이에 따로 내용물만을 분석한 결과 parabens류를 검출 할 수 있었다. 즉 기체에 첨가된 이들 methyl, propyl parabens이 내용물로 이행된 것으로 사료된다. 따라서 연질 캡셀제에 있어서 보존제 시험을 시행할 때에는 캡셀기체뿐 아니라 내용물을 포함한 캡셀제 전체를 시험 대상으로 하여야 할 것으로 생각한다.

보존제 시험기준 및 시험방법을 규정하고 있는 보건원 고시의 기준은 표기량 이하인데 시료 모두 그 기준에 적합하였다. 94년 이전의 고시⁷⁾에서는 방부제 시험의 적용범위를 내복용 액상제제, 안과용제, 주사제, 연고제로 시험 대상 의약품을 한정 하였으나 국립보건원 고시 94-19호(94. 3. 11)⁸⁾에서 그 내용이 개정되어 보존제를 함유하는 의약품이 모두 적용대상이 됨으로써 빠르고 정확한 실험방법이 요구되어 이 실험을 행하였는데 품질관리를 하는데 있어 도움이 되었으면 한다.

結 論

의약품 등에는 보존중 성상 및 품질의 기준을 확보하고, 그 유용성을 높이기 위하여 보존제를 첨가하는데 paraben류는 내복용 제제에 주로 이용된다. 그중에서 연질캡셀제중에 함유된 paraben류를 신속하고 간편하게 추출, HPLC로 정량하는 방법을 검토하여 얻은 결과는 다음과 같다.

1. μ -Bondapak C₁₈ column을 가지고 파장은 UV 254nm, 60% Methanol을 이400

동상 용매로 하여 15분 이내에 HPLC로 분석하였다.

2. 각 연질 캡셀제에서 검출된 paraben의 양은 캡셀당 methyl paraben이 0.2~1.0mg, propyl paraben이 0.03~0.2mg이었고, ethyl paraben과 butyl paraben은 검출되지 않았다.

3. 10건 모두 methyl paraben과 propyl paraben이 혼합 사용됨을 알 수 있었다.

4. 검체에 표준액을 일정량 첨가하여 동일한 추출조작을 하여 얻은 각각의 회수율은 methyl paraben이 96.2~97.5%, ethyl paraben이 98.3~99.1%, propyl paraben이 96.1~97.2%, butyl paraben이 98.0~98.8%로 양호한 결과를 얻었다.

5. 10건의 검체 모두 국립보건원 보존제 시험기준(표기량 이하)에 적합하였다.

參 考 文 獻

1. Fitzpatrick, F.A., Summa, A.F. and Copper, A.D: Quantitative analysis of Methyl and Propyl Paraben High Performance Liquid Chromatography, J. Sic. Cosmet. Chem., 26:377(1975).
2. Nesbitt, DB., Lovelyn, L.H. and H.K. Sleeman: Determination of p-hydroxybenzoate and Propyl p-hydroxybenzoate in an Anticholinergic Antidote by Ion-pair High-Performance Liquid Chromatography J. of Chromatography 166:316(1978).
3. William, PK., Kuria kose. T.J. and Peter T.K.: Liquid Chromatography with Amperometric Detection for Determining phenolic Preservatives. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 63:137(1980).
4. 蔡東圭 등: 의약품 등의 안전성 유효성 검토의뢰서 심사 에 관한 규정. 약사관계 법령집 385(1991).
5. Myung-Hee Kim, Seog-Won Uhm and Sung-Bae Park: Studies on Analytical Methods of preservatives in Food. The Korean Journal of Food Hygiene 3(4):203(1988).
6. 박원희, 김명희: 화장품중의 방부살균제 함량조사. 서울시 보건환경연구원보 25:44(1989).
7. 의약품 기준 및 시험방법(추보 7)중 방부제 시험법 361(1992).
8. 의약품 기준 및 시험방법(추보 8)중 방부제 시험법 141(1994).