

시판 화장품중의 레티놀 유도체에 대한 HPLC에 의한 분석

약품화학팀

이정숙 · 강은미 · 고숙경 · 박원희 · 홍윤정 · 채영주

The analysis of retinol derivatives in cosmetics by HPLC

Pharmaceutical Chemistry Team

Jeong-Sook Lee, Eun-Mee Kang, Suk-Kyung Ko, Won-Hee Park, Yun-Jung Hong,
and Young-Zoo Chae

Abstract

This study was carried out to determine Vitamin A derivatives in domestic and imported cosmetics. 34 cosmetics were analyzed and they were cream, cleanser, lotion, liquid and packs.

The obtained results were as follows:

1. The analytical method was applied with HPLC system of μ -Bondapak C₁₈ column with mobile phase, 100% methanol at 325nm.

2. The calibration curve showed good linearities having r value of 0.9998, 0.9999 and 0.9997, at the range of standard concentrations: retinol(3.4~344.2), retinyl acetate(2.2~109.0) and retinyl palmitate(7.5~422.4)unit/ml were used as standards.

These compounds were successfully separated on the retention time 4.6, 5.4 and 17.3 respectively.

3. The recoveries were obtained as $98.3 \pm 2.3\%$ (RSD:2.34), $93.7 \pm 2.3\%$ (RSD:2.47) and $103.2 \pm 3.6\%$ (RSD:3.52) respectively from the spiked preparations.

4. Samples were extracted as two ways 1. methanol only(sample I) 2. mixture of methanol and chloroform(sample II). Target component in samples was determined as the range of amount 510.9~194019.9 and 502.5~197976.7(unit/g) respectively except four samples.

緒 論

1999년 제정된 화장품법에서 “기능성화장품”이라 함은 “미백에 도움을 주는 제품, 피부주름개선에 도움

을 주는 제품 및 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품”으로 정의하고 있다.¹⁾

생활수준의 향상과 고령화 사회로 들어서면서 피부의 노화방지, 특히 주름개선효과에 대한 관심은 날로

증가되고 있으며, 주름의 생성은 콜라겐의 양과 밀접한 관련이 있고 선택적으로 collagenase나 elastase의 활성 저해와 관계가 있다. 화장품의 사용으로 주름 생성을 방지하는 것은 보습제에 의한 각질층의 수분유지, 자외선 또는 환경으로부터 피부의 보호, 새로운 세포의 생성촉진에 의한 방법이 주로 사용되어진다.²⁾

레티놀 함유 화장품은 비타민A 성분인 레티놀이 피부의 콜라겐 합성을 증가시키고 죽은 각질층의 재생에 관여하며, 새로운 세포생성을 촉진시켜 주름개선효과를 보인다는 점에 착안해 개발된 것이다.³⁾

레티놀은 알콜기(基)를 갖고 있는 알콜로, Retinoic acid에 비해 부작용이 적어 화장품원료로 사용되고 있으나 농도가 높을 경우 부작용을 야기하기도 하므로 제품의 형태 및 사용방법에 따라 첨가하는 레티놀의 양을 적절히 조절하여야 한다. 또한 레티놀성분은 매우 불안정하기 때문에 제조 및 사용과정에서 거의 손실되므로 레티놀과 비타민C를 결합시켜 보호막을 씌우거나 특수한 캡슐 안에 레티놀을 담은 등 레티놀을 안정화시키고 사용 중 공기와의 접촉을 차단하기 위해 특수제작 된 용기를 이용하는 제제기술 발전에 힘입어 안전성, 안정성, 침투력 등이 보완된 제품들이 생산되고 있다.⁴⁻⁶⁾ 그러나 레티놀은 경시변화가 심해 어떤 제품을 표본으로 하느냐에 따라 수치가 크게 달라질 수 있으며, 원료의 단위나 시험방법 등에 따라서도 함량이 크게 달라질 수 있으므로 우리나라에서 1997년 레티놀 함유 제품이 처음으로 생산된 후 많은 제품들이 나왔으나 실제 함량에 대하여 논란이 계속되고 있다.⁷⁾ 이에 저자들은 국산 및 수입레티놀 함유 화장품의 최적분석조건을 확립하고 실제함량을 파악하여 시중유통되는 레티놀 함유 화장품들의 정확한 실태를 파악하고자 본 실험을 시도하였다.

材料 및 方法

1. 재 료

시중에서 유통되고 있는 국산화장품 4종 및 수입화장품 30종을 사용하였다. 실험 검체의 제조원, 검체 Type 및 수량에 대한 내역은 Table 1과 같다.

2. 시 약

표준품은 retinol (Sigma R-7632), retinyl acetate (Sigma R-3513) 및 retinyl palmitate (Sigma R-1512)을 사용하였고, HPLC용 methanol은 HPLC grade, 추출용 methanol과 chloroform은 GR grade를 사용하였다.

3. 기 기

HPLC(Waters/Table 2 참조), Millipore 여과장치(Waters), Ultra sonicator(Branson)를 이용하였다.

4. 실험방법

1) 표준액의 조제

비타민 A 유도체인 retinol, retinyl acetate 및 retinyl palmitate를 각각 14.9, 10.9 및 24.6mg 씩을 취하여 chloroform 5ml에 녹인 후 methanol을 가하여 100ml로 하여 stock solution을 조제하였다.

2) 검량선 작성

위의 stock solution을 각각 희석하여 2.2unit/ml

Table 1. The classification of samples

Manufacturing country	Type	Numbers	Manufacturing country	Type	Numbers
Korea	cream	4	France	cream	4
Monaco	cream	8		liquid	2
	pack	1		cleanser	1
U.S.A	cleanser	1	Spain	cream	1
	cream	6		liquid	1
	cleanser	1	South Africa	cream	1
German	cream	2		liquid	1

Table 2. Analytical condition of HPLC.

Colum	μ -Bondapak C ₁₈
Detector	Waters486 Tunable Absorbance detector
Autosampler	Waters 717 plus Autosampler
Pump	Waters 510
Flow rate	1.0ml/min
Data module	HP3395 integrator
Injection volume	10 μ l
Detection wavelength	UV 325nm
Mobile phase	100% methanol
Chart speed	0.25cm/min

~422.4unit/ml의 세가지 이상의 농도 표준액 10 μ l씩을 HPLC로 분석하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다. (Fig. 1~3)

3) 검액의 조제

① Sample I : 각각의 검체 약 100mg 정도를 취하여 methanol을 가하여 sonication한 후 여과하여 검액으로 하였다.

② Sample II : 각각의 검체 약 100mg 정도를 취하여 chloroform 5ml을 가하여 녹인후 methanol을 넣어 sonication한 후 여과하여 검액으로 하였다.

4) 회수율 측정

retinol, retinyl acetate 및 retinyl palmitate 표준품 일정량을 비타민A 유도체가 포함되어 있지 않은 시료에 spike하여 검액의 조제와 같은 방법으로 추출하여 회수율을 측정하였다.

5) 확인 및 함량

위의 방법에 따라 조제된 표준액 및 검액을 Table 2.의 조건에 따라 HPLC로 분석하여 얻은 peak area를 이용하여 각 시료 중에 함유된 각각의 비타민 A 유도체의 함량을 계산하였다.

結果 및 考察

국내에서 화장품의 품질관리는 식품의약품안전청고시 화장품 기준 및 시험방법에 따라 수행되고 있으나⁸⁾ 제품의 특성성분에 대한 분석보다는 일반적인 안전성에 중점을 둔 이화학적인 실험이 주류를 이루고 있다.

그러나 최근에는 식물, 동물 및 광물 등의 천연자원에서 새로운 물질들이 발견되고 기기분석의 발전 및 제조기술의 발달로 많은 물질의 개발과 합성이 이뤄졌다.

특히 문화수준의 향상과 고령화는 피부관리에 대한 관심을 모았으며 더욱이 대기환경의 변화 중 오존층의 파괴는 대기권에 자외선의 침투를 증가시킴에 따라 청결과 미화목적 기능을 넘어선 보다 과학적인 효능, 효과를 갖춘 화장품의 생산을 유도하게 되었다. 비타민은 오래 전부터 화장품으로 사용되어 왔고 특히 피부 노화에 원인물질인 활성산소에 의한 결합조직 손상을

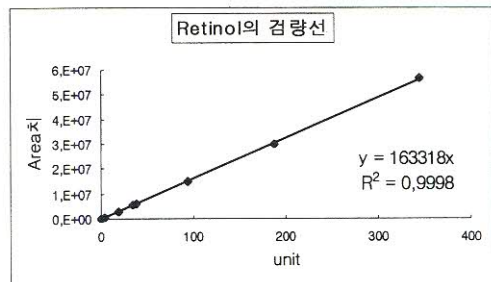


Fig. 1. Calibration curve of retinol standard solution

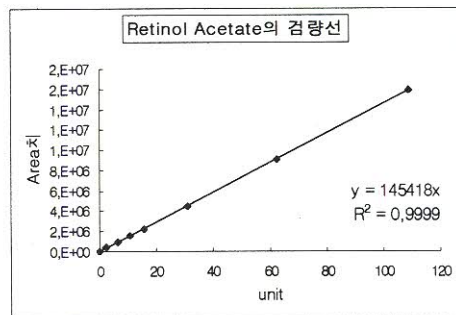


Fig. 2. Calibration curve of retinol acetate standard solution

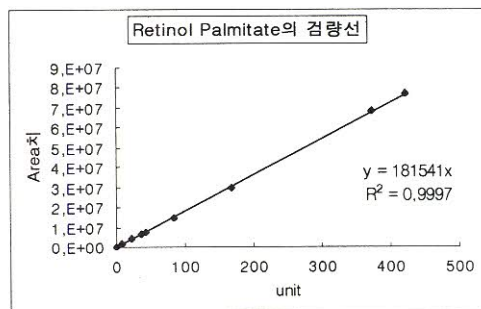


Fig. 3. Calibration curve of retinol palmitate standard solution

Table 3. Recoveries of retinol and derivatives of retinol in spiked sample.

		1	2	3	mean	SD
Retinol	add(unit)	147.8	203.3	244.9		
	found(unit)	146.8	194.5	244.6		
	recovery rate(%)	99.3	95.7	99.9	98.3	2.30
Retinyl acetate	add(unit)	22.0	34.5	216.0		
	found(unit)	20.2	32.0	207.9		
	recovery rate(%)	91.9	92.8	96.3	93.7	2.32
Retinyl palmitate	add(unit)	97.6	108.8	148.8		
	found(unit)	104.1	112.5	147.9		
	recovery rate(%)	106.7	103.4	99.4	103.2	3.63

예방하고 피부세포를 보호하는 비타민A 유도체는 기능성화장품으로서 유래가 깊다⁹⁾. 본 저자들은 국산화장품 4종 및 수입화장품 30종(Table 1)에 대하여 지용성 비타민의 HPLC 분석조건을 약간 수정한 실험조건으로(Table 2) 분석하여 사용된 비타민A 유도체들을 확인하고 함량을 조사하였다. 각각의 레티놀 유도체들은 retinol 3.4~344.2, retinyl acetate 2.2~109.0 및 retinyl palmitate 7.5~422.4unit/ml의 농도범위에서 표준검량선(Fig.1~3)을 작성하였으며 linear regression 및 r값은 retinol $y=163318x$, $r=0.9998$, retinyl acetate $y=145418x$, $r=0.9999$, retinyl palmitate $y=181541x$, $r=0.9997$ 로 양호한

직선관계를 보였다. 표준용액의 chromatogram에서 각각의 retention time은 retinol 4.6분, retinyl acetate 5.4분, retinyl palmitate 17.3분으로 양호하게 분리되었다.(Fig.4) 회수율은 대표적으로 검체 전처리가 어려운 크림류에 대해 실험(Table 3)을 하였으며, 평균±SD값은 retinol 98.3%±2.3, retinyl acetate 93.7%±2.3 그리고 retinyl palmitate 103.2%±3.6이었고 각각의 RSD는 2.34, 2.47 및

Table 4. Identification of target components in sample.

Samle No.	Known	Detected	Samle No.	Known	Detected
1	PR	RP	18	RP	RP
2	R	R	19	RP	RP
3	R	R	20	RP	RP
4	R	R	21	RP	RP
5	RP	RP	22	R	R
6	RP	RP	23	R	R
7	RP	RP	24	R	R
8	RP	RP	25	RP	RP
9	RA	RA	26	RP	ND
10	RP	RP	27	RP	ND
11	RP	RP	28	RP	ND
12	RP	RP	29	RP	RP
13	RP	RP	30	RP	RP
14	R	ND	31	RP	RP
15	RP	RP	32	RP	RP
16	RP	RP	33	RP	RP
17	RP	RP	34	RP	RP

R : retinol RA : retinyl acetate
RP : retinyl palmitate ND : nondetected

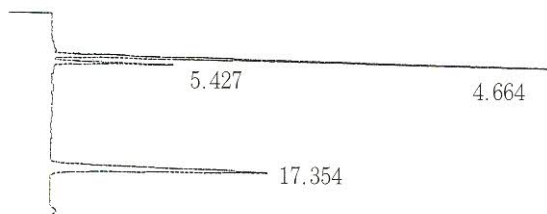


Fig. 4. Chromatogram of retinol, retinyl acetate and retinyl palmitate standard solution



Fig. 5. Chromatogram of sample solution

3.52로 실험조건의 타당성을 확인할 수 있었다. 검체는 methanol만으로 추출한 경우(sample I)와 chloroform으로 선 추출 후 methanol로 재추출한(sample II) 두 방법으로 전처리하였다.

Sample 전처리 방법에 따른 각 비타민A 유도체의 확인은 일치하였고, 그 정량치는 거의 유사한 수치로서 Table 5.에서 볼 수 있으며 그 chromatogram은 Fig.5와 같다. 본 저자들이 실험한 34건 중 4건(크림 2, 팩1 크린저1건)에서 각 비타민A 유도체가 확인 및 정량되지 않았으며 그외의 검체는 제조증명서상에 표기된 각 목적성분과 동일하게 검출됨을 확인(Table 4)할 수 있었다. 2000년 7월부터 시행되는 화장품법에는 기능성화장품이 정의되어 있으므로, 기능성화장품에 대한 효능, 효과를 검증하는 한 방법으로 주성분에 대한 품질관리가 이뤄져야 할 것이다. Table 5에서 보면 retinyl palmitate 및 acetate가 24건 retinol이 6건으로 ester화합물의 사용빈도가 높았으며 retinol은 오일성 리퀴드 4건중 1건, 크림류에 26건중 5건이었고 세안용 제품인 팩과 크린저에서는 검

출되지 않았다. Retinol, retinol acetate 및 retinol palmitate는 methanol과 chloroform 등의 유기용매 및 오일에 잘 녹는 비극성물질이다. 유리 알콜기를 가진 retinol은 공기 중에서 쉽게 산화되어 불안정한 반면 기름용매에 용해된 경우와 acetate와 palmitate 등으로 ester화한 화합물은 안정하여 화장품의 원료로 주로 사용되고 있다고 생각된다. Sample type에 따른 함량은 sample I과 II 방법으로 각각 크림 510.9~36557.7(평균 9326.0), 502.5~36063.1(평균 9349.4), 팩 3670.5, 3667.3, 크린저 2157.3, 2352.7 및 리퀴드 9474.8~194019.9(평균 60997.7), 10999.0~197976.7(평균 62365.8)의 범위에서(Table 6) 관찰되었다. 또한 고농축액으로 한두방울 사용하는 리퀴드 제형이 크림, 팩, 크린저 제형보다 한층 높은 농도로 사용됨을 확인할 수 있었다. 이상의 결과로부터 앞으로 기능성 화장품의 각 주요성분에 대한 확인 및 함량실험은 그 효능효과의 평가와 밀접한 관계가 있으므로 품질관리 시 검증될 부분으로 생각된다. 이들 활성물질은 유통기간과 보관환

Table 5. Assay of target component in sample I and II tested.

Sample No.	Sample type	Detected	Sample I (unit/g)	Sample II (unit/g)	Sample No.	Sample type	Detected	Sample I (unit/g)	Sample II (unit/g)
1	Cream	RP	36557.7	36063.1	18	Liquid	RP	9474.8	11192.8
2	Cream	R	55180.4	54177.7	19	Cream	RP	3247.7	3381.3
3	Cream	R	6886.8	7024.9	20	Cream	RP	3445.3	3478.6
4	Cream	R	8799.9	8563.8	21	Cream	RP	7671.8	7937.6
5	Cream	RP	7499.9	8563.8	22	Cream	R	19000.4	20946.2
6	Cream	RP	1756.9	1758.4	23	Liquid	R	10688.9	10999.0
7	Cream	RP	4412.4	3832.6	24	Cream	R	1914.2	2218.5
8	Cream	RP	3289.3	3344.4	25	Cream	R	2691.9	2718.8
9	Cream	RA	4216.8	4324.3	26	Pack	ND	-	-
10	Cream	RP	1978.9	1925.3	27	Cream	ND	-	-
11	Pack	RP	3670.5	3667.3	28	Cream	ND	-	-
12	Cream	RP	1524.2	1546.1	29	Cream	RP	2063.3	2046.7
13	Cream	RP	6629.0	6426.6	30	Cream	RP	30814.0	30106.1
14	Cleanser	ND	-	-	31	Liquid	RP	194019.9	197976.7
15	Cream	RP	510.9	502.5	32	Liquid	RP	29807.1	29294.6
16	Cream	RP	2038.1	2235.3	33	Cleanser	RP	2157.3	2352.7
17	Cream	RP	1327.9	1091.1	34	Cream	RP	10371.9	11189.8

a) R : retinol RA : retinyl acetate RP : retinyl palmitate ND : nondetected

b) sample I : methanol extracted, sample II : methanol & chloroform extracted value is described as average (n=3), respectively.

Table 6. Assay range according to sample type.

Type	Sample I Assay range (unit/g)	Sample I Assay mean (unit/g)	Sample II Assay range (unit/g)	Sample II Assay mean (unit/g)
Cream	510.9~36557.7	9326.0	502.5~36063.1	9349.4
Pack	3670.5	3670.5	3667.3	3667.3
Cleanser	2157.3	2157.3	2352.7	2352.7
Liquid	9474.8~194019.9	60997.7	10999.0~197976.7	62365.8

a) Sample I : methanol extracted, sample II : methanol & chloroform extracted, ND : nondetected
 b) Value is described as average (n=3), respectively.

경 등에 따라 영향을 받으므로 기존의 일률적인 품질 관리에서 벗어나 제품의 기능을 고려한 성분분석 등을 관리함이 타당할 것이다. 본 저자들이 시도한 HPLC 분석은 신속 정확한 분석방법으로 다량의 검체를 처리할 수 있어 민원의 편의를 도모할 수 있는 장점이 있다. 앞으로 다양한 종류 및 제형의 기능성화장품이 개발되는 추세에 부응하여 정밀 기기분석의 응용과 분석 조건을 개발하여 일괄적이 아닌 개개 제품의 특성성분에 대한 품질관리로 기능성화장품 시대를 맞이 해야할 것이다.

結 論

크림, 리퀴드, 크린저 및 팩 제형에서 안티링클성 기능성화장품의 성분인 비타민A 유도체들의 분석을 실시하였다. 국산화장품 4종 및 수입화장품 30종을 무작위로 선택하여 HPLC 분석조건을 설정하여 retinol, retinyl acetate 및 retinyl palmitate의 확인 및 함량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HPLC 분석조건은 컬럼 μ -Bondapak C₁₈, 이동상은 100% methanol이었으며 검출과장은 325nm였다.
2. 검량곡선은 retinol 3.4~344.2, retinyl acetate 2.2~109.0 및 retinyl palmitate 7.5~422.4 (unit/ml)의 농도 범위에서 r=0.9998, r=0.9999 및 r=0.9997의 좋은 직선

관계식을 나타냈으며 각각의 retention time은 4.6, 5.4 및 17.3분이었다.

3. 회수율은 retinol 98.3±2.3 (RSD: 2.34), retinyl acetate 93.7±2.3 (RSD: 2.47) 및 retinyl palmitate 103.2±3.6 (RSD: 3.52)로 유효한 수치를 나타냈다.
4. Samples I 및 II로 추출방법을 달리했을 때 sample 총 34건 중 4건을 제외하고 목적성분인 retinol, retinyl acetate 및 retinyl palmitate는 각 성분조성표에 기재된 성분과 일치되었으며 추출의 차이에 관계없이 거의 유사한 함량으로 510.9~194019.9 및 502.5~197976.7(unit/g)의 범위로 각각 분석되었다.

參 考 文 獻

1. 화장품법 개정고시
2. 조완구 : 기능성 기초화장품, 대한화장품 학회지 24(2):40(1998)
3. 이옥섭 : 화장품 연구의 현재와 미래, 대한화장품 학회지 24(2):16(1998)
4. 박선규, 장민열, 김영득, 정봉열, 원영호, 김진준, 강세훈 : Medamin A를 함유한 O/W에멀전의 주름 개선 효과, 대한화장품 학회지 25(1): 23(1999)
5. H.H. Kang, J.C. Cho, J.H. Lee, Dr. O.S. Lee : The stability of all-trans-retinol in

- novel liquid crystalline o/w emulsion.
Proceeding of the 20TH IFSCC Congress,
P142(1999)
6. Seung-Ji Lee, Byoung-Kee Jo, Young-Jin
Lee, Chang-Suk Ryu, Beom-Jun Kim,
Chang-Hyun Suk: Retinol stabilization by
pseudo-liposome and lamellar liquid
crystal, Proceeding of the 20TH IFSCC
Congress, P147(1999)
7. 화장품신문: 1999. 7. 12, p4~5
8. 채동규 : 약사관련법규집, 1999년판, 보건법규사,
서울 p557(1999)
9. 박수남 : 천연물의 피부 세포에 미치는 영향 -활성
산소의 작용과 억제. 대한화장품 학회지 25(2):77
(1999)