

액체크로마토그래피를 이용한 화장품 제형 내 세라마이드엔피 분석법 확립

이 예 지[†] · 김 영 은^{*} · 서 재 용^{**} · 조 현 대^{*}

^{*}주코스메카코리아

^{**}건국대학교 화장품공학과, 박사과정생

(2023년 8월 23일 접수, 2023년 10월 4일 수정, 2023년 10월 10일 채택)

Development of Ceramide NP Analysis Method in Cosmetic Formulations Using Liquid Chromatography

Ye Ji Lee[†], Young Eun Kim¹, Jae Yong Seo^{1,2}, and Hyun Dae Cho¹

¹COSMECCA KOREA, 6F, 323 Pangyo-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 13488, Korea

²Department of Cosmetics Engineering, Konkuk University

(Received August 23, 2023; Revised October 4, 2023; Accepted October 10, 2023)

요약: 본 연구에서는, 화장품 중 로션, 크림, 클렌저 제형에 적용된 세라마이드엔피(ceramide NP)의 함량을 분석하고자 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 정량 분석 방법을 개발하였다. 분석은 C18 칼럼을 이용하고 이동상은 아세토니트릴과 메탄올을 70 : 30 비율로, 유속은 0.8 mL/min으로 하고 칼럼 온도는 20 °C로 조건을 설정하였다. 분석 방법은 ICH 가이드라인에 따라 특이성, 직선성, 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ), 정확성, 정밀성을 분석하여 검증하였다. 분석 방법의 유효성 검증 결과, 검량선의 직선성(R^2)은 0.99984로 우수한 직선성을 보였다. 로션, 크림, 클렌저 제형에 대한 정확성은 95.11 ~ 100.48%의 회수율을 통해 확인하였고, 정밀성 분석 결과 상대 표준 편차(RSD)는 0.26% 이하로 나타났다. 검출한계는 0.902 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 2.733 $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다. 이를 통해, 화장품에 적용된 세라마이드엔피의 정량 분석 시, 방해 물질의 영향으로 인해 주피크 분리가 어려운 경우 측정이 가능하게 하여 제품의 품질관리에 도움이 될 것으로 기대된다.

Abstract: In this study, a quantitative analysis method was developed using high-performance liquid chromatography (HPLC) to analyze the content of ceramide NP in lotion, cream, and cleanser formulations in cosmetics. The analysis was performed using a C18 column, and the mobile phase was set at a ratio of 70 : 30 for acetonitrile and methanol, the flow rate was set to 0.8 mL/min, and the column temperature was set to 20 °C. The method was verified by analyzing specificity, linearity, limit of detection, limit of quantitation, accuracy, and precision in accordance with the ICH guidelines. As a result of validating the method, the linearity of the calibration curve was excellent ($R^2 = 0.99984$). The accuracy of the lotion, cream, and cleanser formulations was confirmed with a recovery rate ranging from 95.11% to 100.48%. The precision analysis showed a low relative standard deviation (RSD) of less than 0.26%. The limit of detection was 0.902 $\mu\text{g/mL}$, and the limit of quantitation was 2.733 $\mu\text{g/mL}$. Through this quantitative analysis method of ceramide NP applied in cosmetics, it is expected to assist in the quality control of products by enabling measurement even when it is difficult to separate the main peak due to the influence of interfering substances.

Keywords: cosmetics, ceramide NP, functional ingredient, HPLC, validation

† 주 저자 (e-mail: leeyj49@cosmecca.com)
call: 031-784-6400

1. 서론

화장품은 화장품법(법률 제18448호) 정의에 따라 피부와 신체의 생리적 기능장애나 구조적 변화를 초래하지 않으며 그 작용의 정도는 경미하나 피부의 청결, 아름다움 및 보호를 위해 바르거나 도포하는 물질로 고령화 사회로 진입하면서 화장품의 사용 빈도와 의존도가 증가하고 있으며 남녀노소를 불문하고 소비자층이 넓어져 현재 화장품은 생활 필수품으로 자리매김하고 있다[1]. 화장품은 일상생활에서 쉽게 접하거나 구매할 수 있고, 매일 장시간에 걸쳐 사용하는 제품이기 때문에 소비자의 안전을 위해 제품의 안전성과 품질에 대한 확보는 매우 중요한 부분이다[2].

여러 가지 화학물질의 복합체로 이루어진 화장품은 원료만 해도 10,000여 종 이상으로 이들 성분의 조합에 따라 다양한 제형의 제품이 만들어진다[3]. 화장품에 사용되는 다양한 성분 중 세라마이드는 피부 각질층 주요 세포간지질로 전체 지질의 40 ~ 50%를 차지하며 수분의 증발을 억제하고 외부 요인으로부터 피부를 보호하며 체내 중요 물질의 외부 유출을 방지하는 피부 장벽 기능에 영향을 주는 것으로 알려져 있다[4]. 아토피 피부염, 건조 습진과 같은 건성 피부 상태를 나타내는 대부분의 피부 질환은 각질층의 세라마이드가 감소하거나 변성되어 피부 장벽이 약해져 수분 손실이 커지고 세균이나 바이러스 침투에 취약해지기 때문에 나타난다고 한다[5,6].

세라마이드는 long-chain base (LCB)에 아마이드 결합을 통해 부착된 fatty acid (FA)로 구성되어 있다. 포유류의 LCB는 Table 1과 같이 수산기 및 이중 결합의 수와 위치에 따라 dihydrosphingosine (DS), sphingosine (S), phytosphingosine (P), 6-hydroxysphingosine (H), 그리고 4, 14-sphingadiene (SD)로 5 가지 유형이 있다. FA는 nonhydroxy (N), α -hydroxy (A),

ω -hydroxy (O), 그리고 esterified ω -hydroxy (EO)로 4 가지 유형으로 분류될 수 있다. 인간의 세라마이드는 LCB와 FA의 구성에 따라 20 가지로 분류된다. 각 세라마이드 유형은 FA와 LCB 유형의 약어의 조합을 사용하여 표기된다 [7,8]. 세라마이드 유형 중에서 22% 이상을 차지하는 세라마이드엔피(ceramide NP)는 파이토스핑고신과 nonhydroxy 지방산의 조합이다[9,10]. 세라마이드엔피를 포함하는 연화제는 피부에 수분을 공급하며 피부 장벽의 구조 및 기능에 추가적인 이점을 주어 손상된 장벽 기능을 회복하는 데 도움을 주는 것으로 밝혀졌다[11,12].

세라마이드엔피의 역할이 규명되면서 이를 이용한 화장품의 개발이 다양하게 진행되고 있다. 화장품에 적용된 세라마이드엔피는 정량 분석 시, 크림 제형과 같이 불순물이 많고 점도가 높은 제형의 경우 방해 물질의 영향으로 인해 주피크 분리가 어려운 경우가 있다.

본 연구에서는 원료의 기능성과 안정성을 정량적으로 증명하기 위해 로션, 크림, 클렌저 제형의 화장품에 적용된 세라마이드엔피의 함량을 분석하고자 high-performance liquid chromatography (HPLC)를 이용한 정량 분석 방법을 개발하였고, the international council for harmonisation (ICH) 가이드라인에 따라 유효성을 검증하여 화장품 품질관리에 도움이 되고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

본 실험에 사용한 세라마이드엔피(Gipbio, USA) 표준품은 순도 98% 이상인 제품을 구입하여 사용하였다(Figure 1). 이동상과 전처리 용매로는 HPLC급의 메탄올(Daejung, Korea) 및 아세토니트릴(Daejung, Korea)을 사용하였다. 전처리 과

Table 1. Notation of Ceramide Classes

LCBs ¹⁾ \ FAs ²⁾	Non-hydroxy (N)	α -Hydroxy (A)	ω -Hydroxy (O)	Esterified ω -hydroxy (EO)
Dihydrosphingosine (DS)	NDS	ADS	ODS	EODS
Sphingosine (S)	NS	AS	OS	EOS
Phytosphingosine (P)	NP	AP	OP	EOP
6-Hydroxysphingosine (H)	NH	AH	OH	EOH
4, 14-Sphingadiene (SD)	NSD	ASD	OSD	EOSD

¹⁾ long-chain bases

²⁾ fatty acids

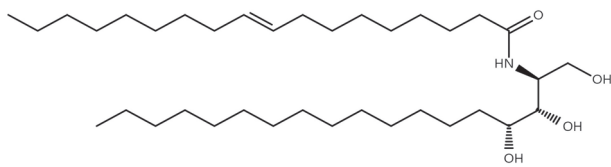


Figure 1. Chemical structure of ceramide NP.

정에서 필터는 PTFE 0.45 μm (Millipore, Germany)를 이용하였다.

2.2. 표준 용액 및 검액의 조제

세라마이드엔피 표준품 10 mg을 정밀하게 취하여 메탄올을 넣어 10 mL로 하여 표준 원액을 조제하였다. 이 액을 메탄올로 희석하여 농도가 10, 20, 150, 200, 300, 500 $\mu\text{g/mL}$ 으로 한 액을 표준 용액으로 하였다.

검액은 시료 약 5 g을 정밀하게 달아 메탄올 50 mL을 넣고 초음파 처리를 하여 분산시킨 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과한 것을 검액으로 하였다.

2.3. 분석 조건

분석 장비는 HPLC (Agilent 1260 II, Agilent Technologies, USA)를 사용하였고, 분석 조건은 Table 2와 같이 C18 칼럼을 이용하였으며 이동상은 아세토니트릴과 메탄올을 70 : 30 비율로, 유속은 0.8 mL/min로 하고 칼럼 온도는 20 $^{\circ}\text{C}$ 로 하여 피크 분리 조건을 설정하였다. 검출 파장은 UV-visible 분광광도계(UV-1900, Shimadzu, Japan)를 사용하여 Figure 2와 같이 최대 흡수파장을 확인한 후 210 nm로 설정하여 검출하였다.

Table 2. HPLC Conditions for the Quantitative Analysis of Ceramide NP

Items	Condition
Instrument	Agilent 1260 II
Mobile phase	Acetonitrile : Methanol = 70 : 30
Column	CAPCELL PAK C18 UG 120 \AA 5 μm , 250 mm \times 4.6 mm
Oven temperature	20 $^{\circ}\text{C}$
Flow rate	0.8 mL/min
Injection volume	10 μL
Detector	UV 210 nm

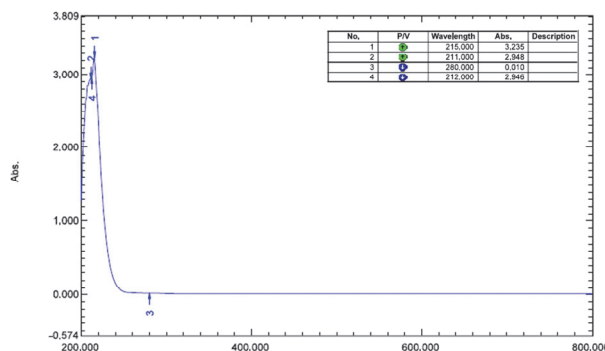


Figure 2. UV-visible absorption spectrum for ceramide NP.

2.4. 분석법 검증

로션, 크림, 클렌저 제형의 화장품에 적용된 세라마이드엔피의 분석법은 ICH 가이드라인 Q2(R2) (2022) 및 의약품 등 시험방법 밸리데이션 가이드라인(2015.12)에 따라 특이성(specificity), 직선성(linearity), 검출한계(limit of detection, LOD) 및 정량한계(limit of quantitation, LOQ), 정확성(accuracy), 정밀성(precision), 용액 안정성(stability of analytical solution)을 검토하였다.

2.4.1. 특이성(Specificity)

분석하고자 하는 물질을 분리하기 어려운 근접한 물질로부터 명확히 분리가 가능한지 확인하기 위해 로션, 크림, 클렌저 제형을 대상으로 확립된 분석법을 적용하여 세라마이드엔피의 선택적 측정 가능 여부를 확인하였고 근접한 성분과의 분리능을 확인하였다. 세라마이드엔피를 포함하지 않은 기제를 대상으로 검액을 조제한 것과 세라마이드엔피를 포함하지 않은 기제에 세라마이드엔피를 최종 농도 200 $\mu\text{g/mL}$ 로 spiking한 용액, 그리고 표준 용액(200 $\mu\text{g/mL}$)을 분석한 크로마토그램을 검토하였다.

2.4.2. 직선성(Linearity)

제형 내 성분의 검출 농도 범위를 고려하여 세라마이드엔피 표준 용액을 10, 20, 150, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 5 개 농도로 각각 조제하여 3 회 반복 측정해 검량선을 작성하고 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값을 이용하여 직선성을 평가하였다.

2.4.3. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)

세라마이드엔피 표준 용액 10, 20, 150, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 5 가지 농도를 각각 3 회 연속 분석하여 3 개의 그룹에 대

한 검량선을 작성하고 검량선의 y절편의 표준 편차 및 기울기 평균값을 이용하여 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ)를 다음식에 따라 계산하였다.

검출한계(LOD) =

$$3.3 \times y\text{절편의 표준 편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

정량한계(LOQ) =

$$10 \times y\text{절편의 표준 편차} / \text{검량선 기울기의 평균값}$$

2.4.4. 정확성(Accuracy)

세라마이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 세라마이드엔피 농도가 정량 곡선 범위 내 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 3 가지 농도가 되도록 표준 물질을 첨가하여 3 회 반복 측정하여 회수율을 통해 정확성을 확인하였다.

2.4.5. 정밀성(Precision)

세라마이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형을 이용해 세라마이드엔피 농도가 200 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 표준 물질을 첨가하여 각각 6 회 반복 전처리한 후 측정하여 상대 표준 편차(relative standard deviation, RSD)를 확인

하는 반복성(repeatability)과 동일 실험실 내에서 다른 시험자가 시험 장비, 시험일을 다르게 분석하여 얻은 측정값으로 실험실내 정밀성(intermediate precision)을 확인하였다.

2.4.6. 용액 안정성(Stability of Analytical Solution)

세라마이드엔피의 전처리 용매인 메탄올에서 용액 안정성을 확인하기 위해 농도가 200 $\mu\text{g/mL}$ 표준 용액을 실온(25 $^{\circ}\text{C}$) 및 냉장(4 $^{\circ}\text{C}$) 상태로 보관하여 0, 24, 48 h 경과 후에 함량을 측정하여 초깃값을 기준으로 회수율을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 특이성(Specificity) 확인

로션, 크림, 클렌저 제형 내에서 방해 물질의 영향 없이 세라마이드엔피 분석이 가능한지 확인하기 위해 표준 용액과 세라마이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저를 대상으로 전처리한 검액 그리고 세라마이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저에 세라마이드엔피를 최종 농도 200 $\mu\text{g/mL}$ 가 되게 spiking한 용액을 분석하였다. 분석한 크로마토그램은 Figure 3과 같으며 이를 상호 비교한

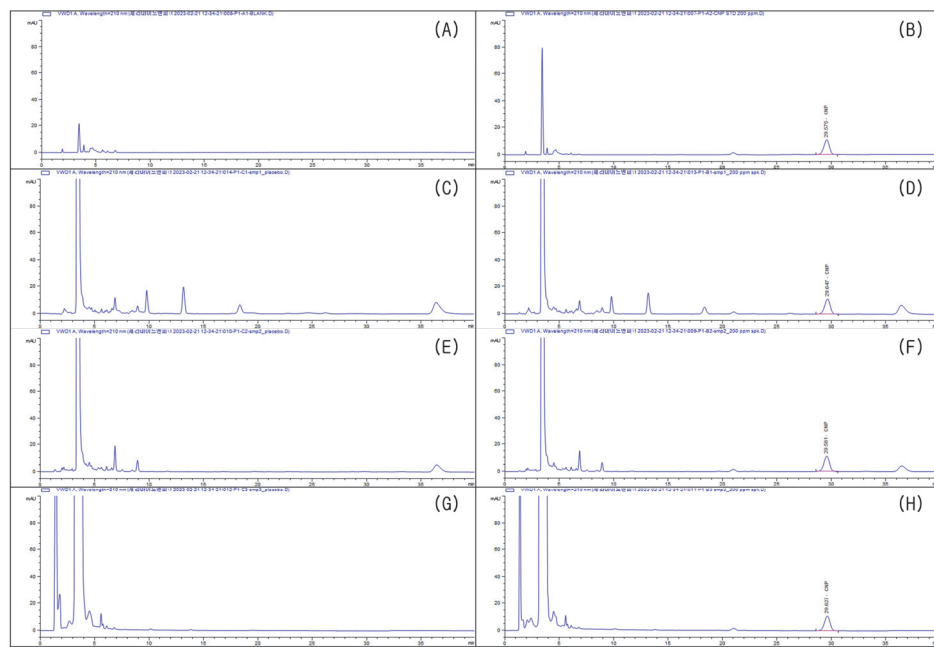


Figure 3. HPLC chromatograms of ceramide NP. (A) blank, (B) standard solution of ceramide NP, (C) placebo solution of lotion formulation, (D) spiking solution of lotion formulation, (E) placebo solution of cream formulation, (F) spiking solution of cream formulation, (G) placebo solution of cleanser formulation, (H) spiking solution of cleanser formulation.

Table 3. Specificity of HPLC Analysis for Ceramide NP

Formulation	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Resolution
Lotion	200	99.72	3.85
Cream	200	100.87	10.73
Cleanser	200	99.35	10.61

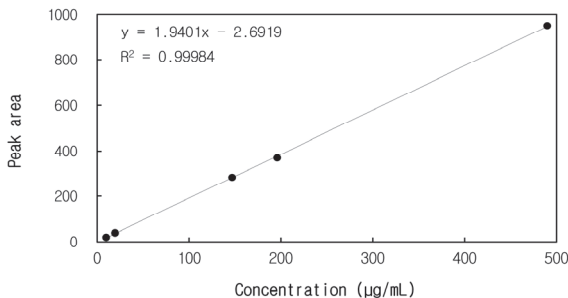
결과, 세라마이드엔피를 포함한 검액에서는 표준 용액과 비교하여 양성의 시험 결과를 얻었고 세라마이드엔피를 포함하지 않은 검액에서는 음성의 시험 결과를 얻었다. 세라마이드엔피를 포함한 검액의 크로마토그램에서 피크 유지 시간(retention time, RT)은 29 min으로 동일 시간대에 세라마이드엔피 피크가 나타났다. 로션, 크림, 클렌저 제형에 세라마이드엔피를 spiking하여 시험한 결과, Table 3과 같이 회수율은 각각 99.72%, 100.87%, 99.35%로 양호한 결과를 얻었고 분리능(resolution)은 3.85, 10.73, 10.61로 서로의 다른 방해 성분들로부터 간섭을 받지 않고 분리되므로 특이성이 있음을 확인하였다.

3.2. 직선성(Linearity) 확인

세라마이드엔피 표준 용액을 10, 20, 150, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 의 5 개 농도로 조제한 후 3 회 반복 측정하여 농도 변화에 따른 크로마토그램 면적값을 이용해 검량선을 Figure 4와 같이 작성하였다. 작성한 검량선의 상관계수(R^2) 값은 0.99984로 0.999 이상의 우수한 직선성을 보였다.

3.3. 검출한계(LOD) 및 정량한계(LOQ) 확인

검출한계와 정량한계는 반응의 표준 편차와 검량선의 기울기에 근거하여 산출하였고 반응의 표준 편차는 y절편의 표준 편차의 평균값을 이용하였다. 직선성 시험을 통해 10, 20, 150, 200, 500 $\mu\text{g/mL}$ 5 가지 농도의 세라마이드엔

**Figure 4.** Calibration curves of ceramide NP.**Table 4.** HPLC Limit of Detection and Limit of Quantitation of Ceramide NP

Instrument	Limit of detection ($\mu\text{g/mL}$)	Limit of quantitation ($\mu\text{g/mL}$)
Agilent 1260 II	0.902	2.733

피 표준 용액을 각각 3 회 연속 분석하여 얻은 각각의 검량선에 대한 y절편의 표준 편차와 기울기 평균값을 구하였다. 이 값을 이용해 검출한계와 정량한계를 산출한 결과는 Table 4와 같으며 세라마이드엔피의 검출한계는 0.902 $\mu\text{g/mL}$, 정량한계는 2.733 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다.

3.4. 정확성(Accuracy) 확인

정확성은 회수율을 이용해 확인하였다. 세라마이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 기준 농도인 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 50%, 100%, 150%에 해당하는 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도가 되도록 세라마이드엔피를 spiking하여 3 회 반복 전처리 후 회수율(%)을 측정하였고 결과는 Table 5와 같다.

세라마이드엔피 회수율은 로션 제형에서 농도별 3 회 평균 99.63 ~ 100.48%, 크림 제형에서 농도별 3 회 평균 95.11 ~ 98.96%, 클렌저 제형에서 농도별 3 회 평균 95.33 ~ 97.17%로 모든 제형에서 95.11 ~ 100.48%의 결과를 얻었고 상대 표준 편차(RSD)는 로션 제형에서 0.57 ~ 1.48%, 크림 제형에서 0.20 ~ 0.30%, 클렌저 제형에서 0.13 ~ 0.35%로 나타나 상대 표준 편차(RSD)가 2.0% 이하로 정확성이 있음을 확인하였다.

3.5. 정밀성(Precision) 확인

3.5.1. 반복성(Repeatability)

세라마이드엔피를 함유하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형을 이용해 세라마이드엔피 농도가 200 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 각각 6 회 반복 전처리하여 동일한 HPLC 조건으로 측정 후 상대 표준 편차(RSD)를 확인하였다. 결과는 Table 6과 같이 상대 표준 편차(RSD)는 로션 제형에서 0.13%, 크림 제형에서 0.20%, 클렌저 제형에서 0.26%로 모든 제형에서 1% 이내의 값을 보여 정밀성을 나타냈다.

3.5.2 실험실내 정밀성(Intermediate Precision)

동일 실험실 내에서 다른 시험자가 시험 장비, 시험일을 다르게 하여 분석해 얻은 측정값으로 실험실내 정밀성을

확인하였다. 세라마이드엔피를 함유하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 세라마이드엔피 농도가 200 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 각각 6 회 반복 전처리하여 동일한 HPLC 조건으로 측정해 상대 표준 편차(RSD)를 확인하였다. 결과는 Table 7 와 같으며 로션 제형에서 0.51%, 크림 제형에서 0.40%, 클렌저 제형에서 1.15%로 모든 제형에서 2% 이내의 값을 확인하였다.

3.6. 용액 안정성(Stability of Analytical Solution) 결과

용액 안정성을 확인하기 위해 세라마이드엔피를 전처리 용매인 메탄올에 넣어 녹여 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도가 되게 한 용

Table 5. Accuracy of HPLC Analysis for Ceramide NP

Formulation	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Recovery (%)	Recovery Mean (%)	RSD (%)
Lotion	100	101.68	100.48	1.48
		98.81		
	200	99.00	99.63	0.57
		99.78		
	300	100.96	100.32	0.84
		99.36		
Cream	100	100.63	98.96	0.22
		99.18		
	200	98.95	98.07	0.30
		98.74		
	300	98.39	95.11	0.20
		97.80		
Cleanser	100	98.02	95.81	0.35
		94.98		
	200	95.33	95.33	0.19
		95.01		
	300	95.92	97.16	0.13
		96.08		
		95.44		
		95.52		
		95.30		
		97.03		
		97.27		
		97.19		

Table 6. Repeatability of Ceramide NP Analysis

Formulation	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Area	Mean \pm SD	RSD (%)
Lotion	200	369.42902	369.62311 \pm 0.48	0.13
		369.63708		
		370.17010		
		370.16623		
		369.39999		
		368.93622		
Cream	200	378.83334	378.37940 \pm 0.75	0.20
		377.90485		
		378.32031		
		377.75101		
		379.65579		
		377.81110		
Cleanser	200	360.64081	361.09895 \pm 0.95	0.26
		361.25482		
		359.44037		
		361.55652		
		362.16339		
		361.53778		

Table 7. Intermediate Precision of Ceramide NP Analysis by Different Analyst on Different Test Days and Equipment

Formulation	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	Area	Mean \pm SD	RSD (%)
Lotion	200	351.76752	348.61072 \pm 1.77	0.51
		349.00500		
		346.73801		
		348.88010		
		347.55994		
		347.71375		
Cream	200	345.65399	344.75499 \pm 1.39	0.40
		346.44186		
		345.34274		
		344.62109		
		343.97400		
		342.49628		
Cleanser	200	356.46765	358.76285 \pm 4.14	1.15
		356.16110		
		355.91272		
		355.87680		
		363.48560		
		364.67322		

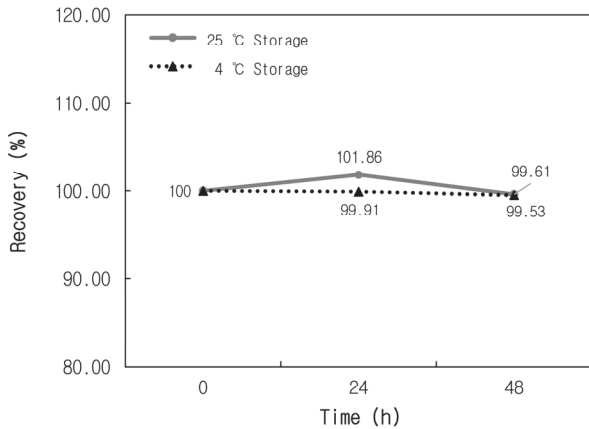


Figure 5. Stability of analytical solution of ceramide NP in methanol.

액을 실온(25 °C) 및 냉장(4 °C) 보관 상태로 0, 24, 48 h 경과 후 분석한 결과는 Figure 5와 같다. 0 h을 기준으로 24, 48 h 후의 회수율이 실온의 경우, 각각 101.86%, 99.61%로 확인되었고, 냉장 보관한 경우, 각각 99.91%, 99.53%의 회수율을 보였다. 세라미이드엔피는 전처리 용매인 메탄올에서 48 h까지 유의적인 함량의 차이는 보이지 않아 시험 용액의 상태는 최소 48 h 동안 안정한 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 화장품 중 로션, 크림, 클렌저 제형 내에서 세라미이드엔피의 정량 분석을 위해 HPLC를 이용하여 분석법을 설정하고 밸리데이션을 통해 분석법에 대한 검증 실시하였다.

분석 조건은 세라미이드엔피의 최대흡수파장을 고려해 분석파장을 210 nm로 설정하였고 이동상 조건은 아세트니트릴과 메탄올을 70 : 30 비율로 하여 피크 유지 시간이 29 min이 되게 설정하였다. 전처리 용매의 경우, 세라미이드엔피의 물성을 고려하여 메탄올을 이용하였고, 용액 안정성 검토를 통해 최소 48 h 동안 안정함을 확인 후 최적의 분석 조건을 설정하였다.

분석법 검증 결과, 표준 용액과 세라미이드엔피를 포함한 검액에서는 동일 시간대에 세라미이드엔피 피크가 나타났으며, 세라미이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 세라미이드엔피를 spiking하여 시험한 결과, 회수율은 각각 99.72%, 100.87%, 99.35%로, 분리능은 3.85, 10.73, 10.61로 특이성이 있음을 확인하였다. 표준 용액 10 ~ 500

$\mu\text{g/mL}$ 범위에서 검량선의 상관계수(R^2)는 0.99984로 우수한 직선성을 나타내었으며, 검출한계는 $0.902 \mu\text{g/mL}$, 정량한계는 $2.733 \mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 세라미이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 100, 200, 300 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 세라미이드엔피를 spiking하여 3 회 반복 측정을 통해 회수율(%)을 확인한 결과, 로션 제형에서 농도별 3 회 평균 99.63 ~ 100.48%, 크림 제형에서 농도별 3 회 평균 95.11 ~ 98.96%, 클렌저 제형에서 농도별 3 회 평균 95.33 ~ 97.16%로 모든 제형에서 95.11 ~ 100.48%의 결과를 얻었고 상대 표준 편차(RSD)는 로션 제형에서 0.57 ~ 1.48%, 크림 제형에서 0.20 ~ 0.30%, 클렌저 제형에서 0.13 ~ 0.35%로 나타나 상대 표준 편차(RSD)가 2.0% 이하로 정확성이 있음을 확인하였다. 세라미이드엔피를 포함하지 않은 로션, 크림, 클렌저 제형에 세라미이드엔피 농도가 200 $\mu\text{g/mL}$ 가 되도록 각각 6 회 반복 전처리하여 분석한 결과, 상대 표준 편차(RSD)는 로션 제형에서 0.13%, 크림 제형에서 0.20%, 클렌저 제형에서 0.26%로 모든 제형에서 1% 이내의 값을 보였고 실험실내 정밀성을 확인한 결과, 상대 표준 편차(RSD)는 로션 제형에서 0.51%, 크림 제형에서 0.40%, 클렌저 제형에서 1.15%로 모든 제형에서 2% 이내의 값을 보여 우수한 정밀성 결과를 확인하였다.

화장품 제형 내 세라미이드엔피 정량 분석법을 확립하고 유효성 검증 과정을 통해 분석법이 적절한 방법임을 확인하였다. 이를 통해, 화장품에 적용된 세라미이드엔피의 정량 분석 시, 방해 물질의 영향으로 인해 주피크 분리가 어려운 경우에 세라미이드엔피의 정량 측정이 가능하게 하여 제품의 품질관리에 도움이 될 것으로 기대된다.

References

1. G. M. Kim, Master's Thesis Dissertation, Sungshin Women's Univ., Seoul, Korea (2011).
2. Y. K. Choi, S. M. Lee, H. J. Kang, J. Y. Jeong, C. S. Min, J. H. Um, J. H. Ahn, S. S. Kim, S. Y. Park, J. P. Lee, and C. W. Park, Analytical method of tocopherol in cosmetics by high performance liquid chromatography, *Reg. Res. FDC*, **10**(1), 47 (2015).
3. G. Y. Kim, Y. K. Bae, E. J. Lee, S. M. Kim, E. A. Kim, and S. R. Ahn, *Cosmetology*, **1**, 80, medician, Paju (2016).
4. U. Yokose, J. Ishikawa, Y. Morokuma, A. Naoe, Y. Inoue,

- Y. Yasuda, H. Tsujimura, T. Fujimura, T. Murase, and A. Hatamochi, The ceramide [NP]/[NS] ratio in the stratum corneum is a potential marker for skin properties and epidermal differentiation, *BMC Dermatol.*, **20**(1), 6 (2020).
5. G. Imokawa, S. Akasaki, M. Hattori, and N. Yoshizuka, Selective recovery of deranged water-holding properties by stratum corneum lipids, *J. Invest. Dermatol.*, **87**(6), 758 (1986).
6. G. Imokawa, A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: Expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosyl ceramide, *J. Dermatol. Sci.*, **55**(1), 1 (2009).
7. J. van Smeden, L. Hoppel, R. van der Heijden, T. Hankemeier, R. J. Vreeken, and J. A. Bouwstra, LC/MS analysis of stratum corneum lipids: ceramide profiling and discovery, *J. Lipid Res.*, **52**(6), 1211 (2011).
8. M. Suzuki, Y. Ohno, and A. Kihara, Whole picture of human stratum corneum ceramides, including the chain-length diversity of long-chain bases, *J. Lipid Res.*, **63**(7), 1 (2022).
9. C. S. Park, Skin barrier, ceramide and phytosphingosine (1996-2016), *J. Skin Barrier Res.*, **18**(1), 58 (2016).
10. L. Coderch, O. López, A. de la Maza, and J. L. Parra, Ceramides and skin function, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**, 107 (2003).
11. S. H. Lim, E. J. Kim, C. H. Lee, G. H. Park, K. M. Yoo, S. J. Nam, K. O. Shin, K. H. Park, and E. H. Choi, A lipid mixture enriched by ceramide NP with fatty acids of diverse chain lengths contributes to restore the skin barrier function impaired by topical corticosteroid, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **35**(2), 112 (2022).
12. S. G. Danby, K. Brown, T. Higgs-Bayliss, J. Chittock, L. Albenali, and M. J. Cork, The effect of an emollient containing urea, ceramide NP, and lactate on skin barrier structure and function in older people with dry skin, *Skin Pharmacol. Physiol.*, **29**(3), 135 (2016).