

A study on the development of hydrocortisone certified reference material in cosmetic cream using isotope dilution-mass spectrometry

Chae-Hong Lee, Ji-Sun Huh, Eun-Ji Jeong, Hyun-Ah Kim, and Min-Young Eom[★]

Consumer Product & Environment Business Division, KOTITI Testing & Research Institute
(Galhyeon-dong) 48, Gwacheon-daero 7na-gil, Gwacheon-si, Gyeonggi-do 13840, Korea

(Received July 28, 2023; Revised December 21, 2023; Accepted December 27, 2023)

동위원소희석-질량분석법을 이용한 화장품 크림 중 히드로코르티손 인증표준물질 개발 연구

이채홍 · 허지선 · 정은지 · 김현아 · 엄민영[★]

KOTITI시험연구원 생활환경사업본부

(2023. 7. 28. 접수, 2023. 12. 21. 수정, 2023. 12. 27. 승인)

Abstract: Steroids have a temporary skin improvement and whitening effect by controlling vasodilation, but they also cause side effects when used for a long time. Therefore, steroids were designated and managed as raw materials that cannot be used in cosmetics in Korea. However, steroids are continuously being detected in cosmetics, causing social issues. In this study, we developed a certified reference material (CRM) for the determination of steroids such as hydrocortisone in cosmetics. A cream-type cosmetic CRM was manufactured and subsequently certified following the guidelines outlined in ISO Guide 35. Homogeneity, short-term stability, and long-term stability were evaluated using isotope dilution mass spectrometry (ID-MS). The certified values were determined by using NIST's primary reference material to ensure traceability. From now on, we intend to supply the certified reference material as a cosmetic CRM to national and international companies, as well as research institutes after certification as certified reference material from KOLAS and registering on COMAR.

요약: 스테로이드는 혈관 확장을 조절하여 일시적인 피부결 향상 및 미백 효과가 있으나, 장기간 사용 시 부작용이 발생하여 국내의 화장품에는 사용할 수 없는 원료로 지정 및 관리 중이며, 지속적으로 기능성 화장품에서 검출되어 회수 및 판매 중지 등과 같은 이슈가 발생하고 있다. 본 연구는 스테로이드의 종류인 히드로코르티손의 분석을 위한 인증표준물질의 개발에 목적을 두고 실험을 수행하였다. 크림형 화장품 매질의 후보표준물질을 제조하였으며 ISO Guide 35의 절차에 따라 수행하였다. 동위원소희석-질량분석법(ID-MS)을 적용하여 균질성, 단기 안정성, 장기 안정성 평가를 수행하였으며, 소급성 연결을 위해 미국국립표준기술연구소(NIST)의 일차표준물질을 사용하여 인증값을 결정하였다. 향후 KOLAS로부터 ISO 17034에 따라 인증표준물질로 인정 후 국제 표준물질 데이터베이스(COMAR)에 등록하여 국내·외 관련 산업계 및 시험기관에 보급할 예정이다.

Key words: certified reference material, ID-MS, cosmetic, hydrocortisone, steroid

[★] Corresponding author

Phone : +82-(0)2-3451-7197 Fax : +82-(0)2-3451-7194

E-mail : my_eom@kr.kotiti-global.com

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

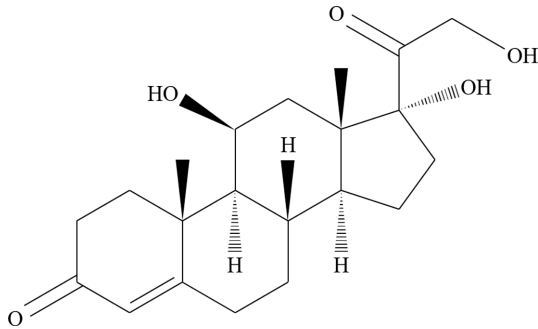


Fig. 1. Chemical structure of hydrocortisone.

1. 서 론

스테로이드(steroid)는 4개의 축합 고리(fused ring)로 3개의 cyclohexane ring과 1개의 cyclopentane ring이 기본 구조인 호르몬이다(Fig. 1).¹ 스테로이드는 작용기전에 따라 성 호르몬과 부신피질 호르몬으로 분류되며, 부신피질 호르몬에는 미네랄코르티코이드(mineralocorticoid), 글루코코르티코이드(glucocorticoid)가 있으며 이들은 지방·단백질의 대사, 면역, 염증, 체내의 염분 및 수분 평형을 조절한다.²

스테로이드는 부신피질의 기능이상으로 발생하는 내분비 장애, 류마티스성 관절염, 전신성 홍반성 루푸스 등의 질병과 피부, 눈, 위장관, 호흡기, 신경계, 알레르기성 등 다양한 질환에서 염증 또는 면역 반응을 억제하는데 사용되고 있다.³ 또한 스테로이드가 함유된 화장품은 혈관 확장을 조절하여 혈관을 통한 염증 세포의 반응을 감소시키고, 거칠어진 피부 장벽 기능을 회복하여 각질이 일어나 따갑고 거친 피부결을 호전시키고 동시에 피부 염증 회복을 통한 일시적인 미백 효과를 가지고 있다.⁴

반면에, 스테로이드를 장시간 또는 오남용할 경우, 인체 내 정상적인 회복 기능을 담당하는 스테로이드 호르몬의 기능 감소, 피부 면역 반응의 저하 및 불균형 등 외부 자극에 대한 정상적인 피부 면역 반응 등이 원활하지 않아 세균 감염, 알레르기, 접촉 피부염 등과 같은 부작용이 발생할 수 있다.^{5,6} 이로 인해, 글루코코르티코이드를 「화장품 안전기준 등에 관한 규정」의 [별표 1] 사용할 수 없는 원료로 지정하여 규제하고 있으나,⁷ 기능성 화장품에서 지속적으로 검출되어 사회적으로 논란이 있었다. 이러한 상황에 맞춰 본 연구에서 크림형 화장품 중 히드로코르티손이 함유된 인증표준물질(CRM, certified reference material)

을 개발하기 위해 수행하였다.

2. 연구 방법

2.1. 시약 및 재료

소급성을 연결하기 위하여 일차표준물질로 미국 국립표준기술연구소(NIST, National Institute of Standards and Technology) Standard Reference Material인 SRM 921a의 히드로코르티손과 동위원소 표준물질은 Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada)의 Hydrocortisone-2,2,4,6,6,21,21-d7을 사용하였다.

크림형 화장품을 제조하기 위하여 원료로 글리세린, 옥수수유, 비즈왁스, 스테릭산, 세틸알코올, 페녹시에탄올, 메틸파라벤은 Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany), 유화왁스는 B&T Company (Arcore, Italy), 히드로코르티손은 Tokyo Chemical Industry Co., Ltd. (Tokyo, Japan)을 사용하였다.

후보표준물질의 제조 및 분석에 사용되는 정제수(resistivity of 18.2 M Ω ·cm)는 Mili-Q (Millipore, USA), 메탄올과 아세트나이트릴은 HPLC 등급의 Burdick & Jackson (Muskegon, MI, USA)의 제품을 사용하였다.

2.2. 후보표준물질의 제조

화장품 원료로부터 수상 혼합물(정제수, 글리세린)과 유상 혼합물(옥수수유, 유화왁스, 비즈왁스, 스테릭산, 세틸알코올, 히드로코르티손)을 각각 혼합하여 65~70 °C 온도에서 용해 후 온도를 유지한 상태로 수상 혼합물을 균질기(Kinematica, Polytron PT 2500 E)에 넣어 5,000 r/min 속도로 혼합하면서 유상 혼합물을 소량씩 첨가하여 크림 제형을 만들었다. 혼합이 완료된 후보표준물질을 실온에서 방치하면서 40~50 °C가 되면 보존제(페녹시에탄올, 메틸파라벤)를 첨가하여 재혼합 후 30 mL 용량의 폴리프로필렌(PP, polypropylene) 용기에 25 g 씩 소분하여 140개의 후보표준물질을 제조하였다.

2.3. 후보표준물질의 인증

후보표준물질은 ISO Guide 35⁸에 따라 평가하였으며, 히드로코르티손의 분석방법은 화장품 중 배합금지 성분 분석법 가이드라인⁹에 따라 후보표준물질을 약 1.0 g을 분취하여 동위원소 치환용액 0.5 mL, 포름산(1→1,000) 1 mL, 메탄올 8.5 mL를 넣은 후 초음파 수조에서 30분간 추출한다. 이후 2,500 r/min에서 10분간 원심분리 후 상층액 4 mL 분취하여 희석액(80%

Table 1. Condition of HPLC-MS/MS for analysis

Category	LC-MS/MS operating conditions			
Column	Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2.1 mm × 1.7 μm)			
Flow rate	0.25 mL/min			
Mobile phase	A : 0.1 % formic acid in Distilled water B : 0.1 % formic acid in Acetonitrile			
Gradient mode	Time (min)	Flow rate (mL/min)	Mobile phase	
			A (%)	B (%)
	0.00	0.25	70	30
	2.00	0.25	70	30
	10.00	0.25	25	75
	10.10	0.25	0	100
	13.00	0.25	0	100
	13.10	0.25	70	30
15.00	0.25	70	30	
Injection Volume	3 μL			
Ionization mode	Electrospray Ionization (ESI, Negative)			
Scan type	MRM (Multiple Reaction Monitoring)			
MS/MS	Compound	Q1 mass (m/z)	Q3 mass (m/z)	
	Hydrocortisone	363	121, 327	
	Hydrocortisone-d7	370	125, 100	

메탄올로 희석시킨 포름산(1→1,000)) 16 mL를 첨가한 후, 0.2 μm PTFE 멤브레인 필터로 여과한 용액을 동위원소희석-질량분석법(ID-MS, Isotope dilution mass spectrometry)을 적용하여 액체크로마토그래피 질량분석기(LC-MS/MS, Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer)로 측정하였다. 저울 및 초자류는 검교정이 완료된 것을 사용하였으며, SI 단위계를 유지하기 위하여 중량법(gravimetric method)을 적용하였고, 측정의 소급성 연결을 위해 NIST의 SRM 921a를 사용하여 산출하였다.

2.4. 분석 방법의 유효성 확인

시험방법의 유효성을 확인하기 위하여 KOLAS-G-015 화학적 시험방법의 유효성 확인을 위한 지침¹⁰에 따라 Table 1과 같은 조건에서 직선성, 방법검출한계, 정량한계, 정확도, 정밀도 및 측정불확도를 산출하였다.

2.4.1. 동위원소희석-질량분석법(ID-MS)

동위원소희석-질량분석법은 불확도가 가장 적은 결과를 생산하는 분석 방법으로 국제도량형위원회(CIPM, International Committee for Weights and Measures)에

서 지정한 최상위 측정 방법(primary method of measurement)이며, 각 나라의 표준기관(NMIs, National Metrology Institute) 및 표준물질생산기관(ISO 17034)에서 인증표준물질 개발에 주로 사용된다.¹¹⁻¹⁴

동위원소희석-질량분석법은 대상물질과 동위원소 간의 동위원소비(isotope ratio)로 질량 분율을 결정하는 방법으로, 시료의 전처리 과정에서 발생하는 손실을 보정할 수 있을 뿐만 아니라 동위원소비로 측정하기 때문에 기질 효과(matrix effect)로 인한 큰 영향을 받지 않는 장점이 있다.

$$C_{sample} = \frac{M_{is-sol,spike} \times AR_{sample} \times M_{s-sol,std} \times C_{s-sol}}{W_s \times AR_{std} \times M_{is-sol,std}} \quad (1)$$

여기서, $M_{is-sol,spike}$ 는 후보표준물질에 첨가된 동위원소 표준용액의 무게, $M_{s-sol,std}$ 는 측정표준용액에 첨가한 히드로코르티손의 무게, $M_{is-sol,std}$ 는 측정표준용액에 첨가한 동위원소의 무게, AR_{sample} 는 후보표준물질에서 측정된 히드로코르티손과 동위원소의 면적비, AR_{std} 는 측정표준용액의 히드로코르티손과 동위원소의 면적비, C_{s-sol} 는 측정표준용액의 농도, W_s 는 후보표준물질의 분취량을 의미한다.

2.4.2. D-LC-MS/MS 표준용액 제조

SRM 921a의 히드로코르티손 0.01 g을 10 mL 메탄올에 용해하여 1,000 mg/kg 농도의 stock solution을 만든 후 이를 메탄올로 10 mg/kg의 농도까지 희석하였으며, 동위원소인 Hydrocortisone-2,2,4,6,6,21,21-d7을 0.01 g 분취하여 메탄올로 용해 후 10 mg/kg의 농도로 희석하였다. SI 단위계를 유지하기 위하여 분취, 용해, 희석 등 단계마다 정확한 무게를 정확히 측정하여 질량 분율을 적용한 농도로 사용하였다.

2.4.3 직선성(linearity)

일정한 범위 내 있는 분석 물질의 농도변화에 따른 측정값 사이의 관계를 나타내는 검정곡선에서 결정계수(R²)를 산출하였다. 히드로코르티손을 7개의 단계별 농도(0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 0.75, 1.0 mg/kg)로 제조 후 4 회 반복 측정하였다.

2.4.4. 방법검출한계(MDL) 및 정량한계(LOQ)

방법검출한계(MDL, method detection limit)는 측정대상을 검출할 수 있는 최소한의 농도로써 크립형 화장품에 정량한계 부근의 농도에 해당하는 히드로코르티손을 첨가하여 7개를 제조 후 반복 측정하여 얻은 결과의 표준편차에 99 % 신뢰도에서 t-분포값을 곱하여 산출하였다. 정량한계(LOQ, limit of quantification)는 정량 할 수 있는 측정값으로 표준편차에 10 배를 곱하여 산출하였다.

2.4.5. 정확도(accuracy) 및 정밀도(precision)

정밀도는 동일한 분석조건에서 반복적인 실험 결과 간의 근접성을 나타낸 것으로 히드로코르티손을 4회 반복 측정한 결과의 평균값과 상대표준편차(RSD, relative standard deviation)로 산출하였으며, 정확도는 ‘spike sample’을 이용하여 크립형 화장품에 SRM 921a를 첨가하여 크립형 화장품의 히드로코르티손 분석값(C_{AM})과 첨가하지 않은 크립형 화장품의 분석값(C_S)과의 차이를 첨가한 농도(C_A)의 상대백분율로 산출하였다.

$$\text{정확도(\%)} = \frac{C_{AM} - C_S}{C_A} \times 100 \quad (2)$$

2.4.6. 측정불확도(measurement uncertainty)

측정불확도는 측정 결과와 관련하여 측정량을 합리적으로 추정된 값의 산포특성을 나타내는 파라미터이다. 후보표준물질을 각 10회 반복 측정하여 식 (1)을

사용하여 히드로코르티손의 결과 산출에 영향을 미치는 불확도 요인들에 대한 A형, B형 평가를 수행하여 측정불확도를 산출하였다.

2.5. 균질성 및 안정성 평가

2.5.1. 균질성 평가

대부분의 후보표준물질은 구성단위(예:병, 바이알 또는 시험편)의 배치로 제조된다. 균질성은 물질의 개별 특성값의 구성단위 간 또는 각 구성단위 내 변동을 나타낼 수 있다. 균질성 평가는 ISO Guide 35의 절차에 따라 수행하였으며, 생산된 후보표준물질의 균질성 연구에 대한 최소 구성단위 수는 식 (3)에 따라 계산하여야 하나, 소규모로 생산된 구성단위(N_{prod} ≤ 1,000개)는 ISO Guide 35에서 제시하는 최소 구성단위 수인 10개를 단순 무작위 샘플링을 통하여 후보표준물질을 선정하였다.

$$N_{\min} = \max(10, \sqrt[3]{N_{\text{prod}}}) \quad (3)$$

여기서, N_{prod}은 동일한 배치에서 생산된 후보표준물질의 총 수량을 의미한다.

균질성에 발생하는 불확도는 일원 분산분석법에 따라 구성단위 간 표준편차(between-bottle variance, S_{bb})와 구성단위 내 표준편차(within-bottle variance, S_{wb})를 5 % 유의수준에서 식 (4)~(6)에 따라 산출하였으며, 본 연구에서는 누락된 데이터가 없으므로 n₀가 n이 같다.

$$S_{bb}^2 = \max\left(\frac{M_{\text{between}} - M_{\text{within}}}{n_0}, 0\right) \quad (4)$$

$$S_{bb} = \sqrt{S_{bb}^2} \quad (5)$$

$$S_r = \sqrt{M_{\text{within}}} \quad (6)$$

여기서, S_{bb}²는 구성단위 간 분산, M_{between}은 구성단위 간 평균제곱, M_{within}은 구성단위 내 평균제곱, n₀는 구성단위 당 관측수, S_{bb}는 구성단위 간 표준편차, S_r는 반복성 표준편차를 의미한다.

균질성에 의한 표준불확도는 식 (7)에 따라 산출할 수 있다.

$$\frac{M_{\text{between}} - M_{\text{within}}}{n_0} \leq u_{bb}^2 \leq \frac{S_{bb}^2 + S_r^2}{n_0} \quad (7)$$

낮은 불균질성에 대한 양호한 증거를 제공하기 불충분할 경우 ISO Guide 35에 따라 불균질성과 연관된 불확도에 대해 더 보수적인 식 (8)을 사용하여 표준불

확도를 산출하였다.

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{M_{within}}{n_0}} \cdot \sqrt{\frac{2}{V_{M_{within}}}} \quad (8)$$

여기서, u_{bb} 는 구성단위 간 불균질성으로 인한 표준 불확도, $v_{M_{between}}$ 은 M_{within} 의 자유도를 의미한다.

2.5.2. 안정성 평가

후보표준물질의 안정성은 규정된 보관 조건 하에 유효기간 동안의 물질의 안정성과 운송 조건 하의 안정성에 의한 것으로 장기 안정성과 단기 안정성으로 구분할 수 있다. 본 연구에서 단기 안정성은 운송 조건(-20 °C, 40 °C)과 보관 조건(25 °C)을 설정 후 각각의 온도에서 후보표준물질을 3 개씩 보관 후 7 일 간격으로 총 28일 간 측정하여 단기 안정성 인자(R_T)와 불확도(u_{R_T})를 구하여 범위 내에 1을 포함 여부로 판단하였다.

$$R_T = \overline{X_{25^\circ C}} / \overline{X_{T^\circ C}} \quad (9)$$

$$u_{R_T} = R_T \sqrt{\left[\frac{\sigma_{25^\circ C}}{\overline{X_{25^\circ C}}} \right]^2 + \left[\frac{\sigma_{T^\circ C}}{\overline{X_{T^\circ C}}} \right]^2} \quad (10)$$

여기서, \bar{X} 와 σ 는 각 보관 온도의 측정 결과에 대한 평균값과 표준편차를 의미한다.

장기 안정성은 후보표준물질을 보관 조건인 25 °C에서 1개월, 3개월, 6개월, 12개월 간격으로 측정하여 6개월까지 측정된 결과를 식 (11)~(16)에 따라 표준 불확도를 산출하였으며, 12개월의 결과는 모니터링 결과로 활용할 계획이다.

$$b_1 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (11)$$

$$b_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x} \quad (12)$$

$$s(b_1) = \frac{s}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - b_0 - b_1 x_i)^2}{n-2} \quad (14)$$

$$|b_1| < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1) \quad (15)$$

$$u_{lts} = s(b_1)(t_{m1} + t_{cert}) \quad (16)$$

여기서, b_0 와 b_1 은 회귀계수이며 안정적인 표준물질의 b_1 은 0으로 예상, ε 은 임의 오차성분, x 는 시간, y 는 후보표준물질의 특성값, $s(b_1)$ 은 b_1 의 추정 표준편차를 의미하며 회귀계수의 기울기 추정값(b_1)의 절대값이 자유도 $n-2$ 의 t-분포값에 추정된 기울기의 표준 오차 $s(b_1)$ 을 곱한 값보다 적으면 유의성이 없다고 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 분석 방법의 유효성 확인

후보표준물질의 인증값 산출을 위하여 SRM 921a의 히드로코르티손과 동위원소를 사용한 동위원소희석-질량분석법의 검증 결과는 Table 2와 같다. 유효성 확인을 위하여 검정곡선은 0.01~1.00 mg/kg의 범위로 7개의 농도 구간을 제조 후 각 4회 반복 측정하여 산출된 결정계수(R^2)는 0.9911임을 확인하였으며, 방법검출한계는 0.44 mg/kg, 정량한계는 1.39 mg/kg, 정확도 및 정밀도는 98.63%와 1.27%임을 확인하였다.

유효성이 확인된 분석 방법으로 식 (1)의 7가지 불확도 요인에 대한 평가를 위하여 10개의 후보표준물질을 반복 측정한 결과, 평균 측정값은 8.92 mg/kg, 표준편차는 0.2908 mg/kg, 변동계수는 3.26%로 이를 바탕으로 Table 3과 같이 측정불확도를 산출하였으며, C_{s-sol} 인 측정표준용액의 농도에 대한 불확도 산출은 표준용액 제조에 사용된 측정 저울에 대한 교정, 분해능, 반복측정에 대한 불확도와 표준용액 제조에 사용된 SRM 921a 인증서의 불확도를 반영하여 산출하였다.

3.2. 균질성 평가

생산된 140 개의 후보표준물질에 대하여 단순 무작위 샘플링으로 채취된 10개의 후보표준물질을 하위

Table 2. Results of method validation of Hydrocortisone using ID-MS

Compound	Linearity (R^2) (n=7)	MDL (mg/kg) (n=7)	LOQ (mg/kg) (n=7)	Accuracy (%) (n=4)	Precision (%) (n=4)
Hydrocortisone	0.9911	0.44	1.39	98.63	1.27

Table 3. Results of Measurement uncertainty

Factor	Type evaluation	Standard uncertainty	Relative standard uncertainty (%)	Effective degrees of freedom	Contribution rate (%)
$M_{is-sol,spike}$	A, B	0.0002 g	0.0017	18	0.7
AR_{sample}	A	0.0238	0.0103	9	24.1
$M_{s-sol,std}$	A, B	0.0002 g	0.0017	188	0.7
C_{s-sol}	A, B	0.0002 mg/kg	0.0159	189	57.1
W_s	A, B	0.0005 g	0.0005	11	0.1
AR_{std}	A	0.0166	0.0086	5	16.8
$M_{is-sol,ste}$	A, B	0.0002 g	0.0017	188	0.7

Table 4. Result of homogeneity for Hydrocortisone by ANOVA analysis

Source of variation	Sum of Squares	Degrees of Freedom	Mean Square	F-ratio	p-value	F-critical
Between bottles	0.6684	9	0.0743	1.1061	0.4020	2.3928
Within bottles	1.3428	20	0.0671			
Total	2.0112	29				

Table 5. Result of short-term stability for Hydrocortisone by concentration difference between Temperature

		-20 °C	25 °C	40 °C
Average Cone. (mg/kg) (n=3)	1 Week	9.0202	8.9374	8.9669
	2 Week	8.8577	8.9667	8.9623
	3 Week	8.8164	8.7724	8.9759
	4 Week	8.8865	8.7563	8.9375
Average (mg/kg)		8.8952	8.8582	8.9607
SD (mg/kg)		0.1076108	0.1546724	0.1223397
CV (%)		1.21	1.75	1.37
R_T		0.9958		0.9886
u_{R_T}		0.0167		0.0161
$R_T \pm u_{R_T}$		0.9792 < 1 < 1.0125 (Stable)		0.9725 < 1 < 1.0047 (Stable)

샘플링(sub-sampling) 방법을 사용하여 1개의 후보표준물질에서 각 3개의 하위 샘플을 제조 후 1개의 하위 샘플 당 3회 반복 측정하였다. 측정된 결과를 일원 배치분석 및 평균값의 표준편차를 산출하여 균질도를 평가한 결과, Table 4와 같이 신뢰수준 95%에서 F-비(1.1061)가 F-기각치(2.3928) 보다 작으므로 유의성이 없는 것을 확인하여 충분한 균질성을 확보하였다.

3.3. 안정성 평가

3.3.1. 단기 안정성 평가

단기 안정성 평가의 온도 조건인 상온(25 °C), 저온(-20 °C), 고온(40 °C)에서 후보표준물질을 1주일 간격으로 총 4주 보관 후 하위 샘플링 방법으로 측정한

결과, Table 5와 같이 변동계수가 1.21~1.75% 범위로 온도별과 온도간에 변동이 거의 없는 것으로 확인하였다. 또한 보관 온도(25 °C)와 운송 온도(-20 °C, 40 °C) 조건의 단기 안정성 인자(R_T)와 불확도(u_{R_T})를 구하여 범위 내에 1을 포함하는 여부로 판단한 결과 안정적인 것으로 확인할 수 있었다.

3.3.2. 장기 안정성 평가

장기 보관으로 인한 안정성을 확인하기 위하여 6개월 동안 4차례에 걸쳐 후보표준물질을 각 3개씩 하위 샘플링 방법으로 측정된 결과에 대하여 회귀분석을 이용하여 평가한 결과, Fig. 2와 Table 6과 같이 n-2 자유도와 95% 신뢰수준에서 $p=0.95$ 일 때, Student's

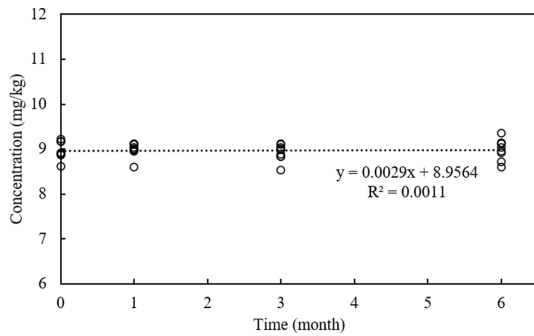


Fig. 2. Results for long-term stability study.

Table 6. Result of long-term stability for Hydrocortisone by regression analysis

	0 month	1 month	3 month	6 month
Average (mg/kg)	8.96	8.98	8.93	8.99
SD (mg/kg)	0.19	0.16	0.18	0.23
CV (%)	2.15	1.76	2.05	2.57
b_1			0.003	
$s(b_1)$			0.008	
$t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$			0.034	
$ b_1 < t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$	0.003 < 0.034 (Stable)			

t-factor (4.30)에서 회귀계수의 기울기 추정 절대값 $|b_1|$ 이 $t_{0.95, n-2} \cdot s(b_1)$ 보다 작아 결과적으로 불안정성은 관찰되지 않은 것으로 확인하였다.

3.4. 인증값 산출

본 연구에서 개발된 크림형 화장품의 히드로코르티손의 인증값은 10개 후보표준물질에 대해 하위 샘플링 방법으로 반복 측정하여 측정된 결과의 평균값으로 인증값을 산출하였으며, 특성화, 균질성, 단기 안정성, 장기 안정성에 대한 결과를 식 (17)~(18)을 사용하여 합성표준불확도(u_{CRM})를 계산 후 95% 신뢰수준에서 포함인자(k)와 합성표준불확도를 곱하여 확장불확도(U_{CRM})를 산출하였다.

$$u_{CRM} = \sqrt{u_{char}^2 + u_{hom}^2 + u_{sts}^2 + u_{lts}^2} \quad (17)$$

$$U_{CRM} = k \times u_{CRM} \quad (18)$$

여기서, u_{char} 은 특성화 연구에서 설정한 값과 연관된 표준불확도, u_{hom} 은 불균질성(heterogeneity)과 연관된 표준불확도, u_{sts} 는 단기 안정성과 연관된 표준불확도, u_{lts} 는 장기 안정성과 연관된 표준불확도, u_{CRM} 은 인증표준물질의 특성값과 연관된 표준불확도를 의미

Table 7. Certified values and uncertainties of the cosmetic CRM

Description	Hydrocortisone (mg/kg)
x_{CRM}	8.92
u_{char}	0.1876
u_{hom}	0.1573
u_{sts}	0.0000
u_{lts}	0.0615
u_{CRM}	0.4115
k (95 % level of confidence)	2
U_{CRM}	0.8229

한다.

산출 결과 Table 7과 같이 인증표준물질의 개발 목표치인 불확도 범위 10% 이내로 확인되어 (8.92 ± 0.83) mg/kg을 최종 인증값으로 설정하였다.

4. 결 론

화장품 중의 스테로이드 분석용 인증표준물질을 개발하기 위해 수상 혼합물과 유상 혼합물을 각각 제조한 후 균질기로 혼합하여 최종적으로 크림형 화장품 후보표준물질을 개발하였다. 후보표준물질에 대한 특성값의 산정, 균질성 및 안정성을 평가하기 위하여 화장품 중 배합금지성분 분석법 가이드라인의 방법과 동위원소희석-질량분석법으로 하위 샘플링 방법을 적용하여 후보표준물질에 대한 측정 및 평가를 수행하였다.

후보표준물질의 평가는 ISO Guide 35에 규정된 절차에 따라 평가하였으며, 균질성 평가는 일원 배치분석으로 신뢰수준 95%에서 F-비가 F-기각치보다 작아 균질한 것으로 확인하였다. 또한, 단기 안정성 평가에서는 단기 안정성 인자와 불확도를 기준으로 온도별과 온도간의 변동이 거의 없는 것으로 확인되었으며, 장기 안정성 평가에서는 기울기 추정 절대값이 자유도 $n-2$ 의 t-분포값에 추정된 기울기의 표준오차를 곱한 값보다 작아 불안정성이 관찰되지 않은 것으로 확인되었다. 인증값의 확장불확도는 10% 이내로 임을 확인하였다.

향후 본 연구에서 개발된 스테로이드 분석용 크림형 화장품 인증표준물질은 화장품의 원료 및 제품에 대한 품질관리 및 모니터링에 효과적으로 사용할 수 있으며, 국내·외 시험분석기관의 시험방법의 유효성 평가, 분석 장비의 교정 및 숙련도 평가 등 분석 결과

에 대한 신뢰성 향상의 목적으로 다양하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 국가표준기술 개발 및 보급 사업인 “상용표준물질 개발보급(과제번호 : 20020450)”의 지원에 의해 수행된 연구입니다.

References

1. H. K. Seo, *J. Korean. Acad. Fam. Med.*, **19**(10), 776-786 (1998).
2. J. M. Kim, and S. H. Park, *Korean. J. Med.*, **77**(3), 298-303 (2009).
3. S. C. Manson, R. E. Brown, A. Cerulli, and C. F. Vidaurre, *Respir. Med.*, **103**, 975-994 (2009). <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2009.01.003>
4. V. K. Dey, *Indian Dermatol. Online J.*, **5**(4), 436-440 (2014). <http://doi.org/10.4103/2229-5178.142486>
5. A. Bewley, *Br. J. Dermatol.*, **158**, 917-920 (2008). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08479.x>
6. T. Hajar, Y. A. Leshem, J. M. Hanifin, S. T. Nedorost, P. A. Lio, A. S. Paller, and E. L. Simpson, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **72**(3), 1-9 (2015). <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.11.024>
7. Ministry of Food and Drug Safety No. 2023-17(2023.02.21), Republic of Korea.
8. International Organization for Standardization, ISO Guide 35:2017, Reference materials — Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability, Geneva, 2017.
9. Ministry of Food and Drug Safety, 화장품 중 배합금지성분 분석법 가이드라인(민원인 안내서), <https://www.mfds.go.kr/docviewer/skin/doc.html?fn=20220623094238139.pdf&rs=/docviewer/result/data0011/15020/1/202307>, Accessed 23 June 2023.
10. Korean Agency for Technology and Standards No. 2021-91(2021.04.08.), Republic of Korea.
11. J. S. Jung, J. W. Park, S. Yoo, S. I. Kweon, S. T. Hong, Y. S. Sun, C. M. Park, and C. H. Choi, *Anal. Sci. Technol.*, **25**(5), 273-283 (2012). <https://doi.org/10.5806/AST.2012.25.5.273>
12. W. Y. Lee, Y. H. Yim, E. J. Hwang, Y. R. Lim, T. K. Kim, and K. S. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **35**(3), 821-827 (2014). <https://doi.org/10.5012/bkcs.2014.35.3.821>
13. J. W. Lee, S. W. Heo, H. J. Kim, Y. R. Lim, K. S. Lee, and Y. H. Yim, *Mass Spectrom. Lett.*, **9**(4), 105-109 (2018). <https://doi.org/10.5478/MSL.2018.9.4.105>
14. S. Y. Lee, K. S. Kim, H. S. Kwon, Y. E. Kim, K. Y. Kim, J. S. Jeong, H. B. Oh, T. Y. Kim, J. K. Hong, and D. J. Kang, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **40**(5), 418-423 (2019). <https://doi.org/10.1002/bkcs.11703>

Authors' Positions

Chae-Hong Lee : Senior Researcher
 Ji-Sun Huh : Senior Researcher
 Eun-Ji Jeong : Senior Researcher
 Hyun-Ah Kim : Junior Researcher
 Min-Young Eom : Principal Researcher