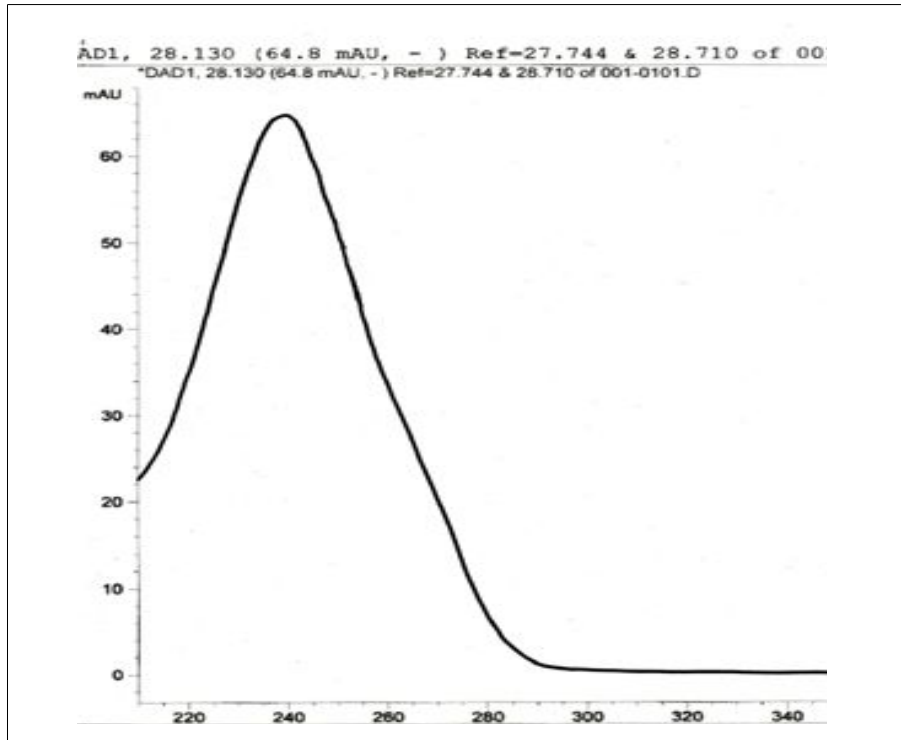


## 화장품 중 스테로이드류<sup>1)</sup> 검출을 위한 시험법

**확인시험** 1) 정량법 1에 따라 시험할 때 검액과 표준액의 유지시간이 같고 분리된 피크가 아래와 같은 흡수 극대를 나타낸다.



2) 정량법 2에 따라 시험할 때 검액과 표준액의 유지시간이 같고 동일한 질량분석 스펙트럼을 나타낸다.

### 정량법 1) HPLC-PDA법

검체 약 4.0 g을 정밀하게 달아 메탄올 적당량을 넣어 1 시간 초음파처리하고 메탄올을 넣어 20.0 mL로 한다. 이 액을 3000 rpm에서 10 분간 원심분리한 다음 상층액을 취하고 0.2  $\mu$ m 필터로 여과하여 검액으로 한다. 따로 베클로메타손 (beclomethasone), 21-초산베클로메타손 (beclomethasone 21-acetate), 17-프로피온산베클로메타손 (beclomethasone 17-propionate), 21-프로피온산베클로메타손 (beclomethasone 21-propionate), 21-헤미호박산베클로메타손 (beclomethasone 21-hemisuccinate), 17, 21-디프로피온산베클로메타손 (beclomethasone 17, 21-dipropionate), 베타메타손 (betamethasone), 21-초산베타메타손 (betamethasone

1) 현재 이 시험법으로 확인한 스테로이드는 합성글루코코르티코이드 28종이고 지속적으로 추가될 예정임

21-acetate), 17-길초산베타메타손(betamethasone 17-valerate), 21-길초산베타메타손(betamethasone 21-valerate), 21-헤미호박산베타메타손(betamethasone 21-hemisuccinate), 17, 21-디프로피온산베타메타손(betamethasone 17, 21-dipropionate), 부테소니드(budesonide), 17-프로피온산클로베타솔(clobetasol 17-propionate), 21-초산코르티손(cortisone 21-acetate), 덱사메타손(dexamethasone), 21-초산덱사메타손(dexamethasone 21-acetate), 21-헤미호박산덱사메타손(dexamethasone 21-hemisuccinate), 히드로코르티손(hydrocortisone), 17-초산히드로코르티손(hydrocortisone 17-acetate), 21-초산히드로코르티손(hydrocortisone 21-acetate), 17-길초산히드로코르티손(hydrocortisone 17-valerate), 21-길초산히드로코르티손(hydrocortisone 21-valerate), 프레드니솔론(prednisolone), 21-초산프레드니솔론(prednisolone 21-acetate), 21-초산프레드니손(prednisone 21-acetate), 트리아시놀론아세토니드(triamcinolone acetone), 초산트리아시놀론 (triamcinolone diacetate), 디클로리손 아세테이트 (dichlorisone acetate)의 200 ppm 표준원액을 각각 취하여 메탄올을 넣어 1, 5, 10, 50 ppm이 되도록 하여 표준액으로 한다.

검액 및 표준액 10 µL를 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래프법의 검량선법에 따라 시험하여 검액 중 스테로이드의 양을 구한다.

< 조작조건 >

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 245 nm)

칼럼 : 안지름 약 4.6 mm, 길이 약 250 mm인 스테인레스강관에 5 µm의 액체 크로마토그래프용 옥타데실실리카겔을 충전한다.

칼럼온도 : 30 °C

이동상 : A - 아세토니트릴

B - 물

이동상의 농도구배 및 용매조성

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0 ~ 20	30	70
20 ~ 35	60	40
35 ~ 45	100	0
45 ~ 50	100 → 30	0 → 70
50 ~ 55	30	70

유량 : 1.0 mL/분

정량한계 : 1 µg/mL

[상대유지시간(RRT)]

기준	no.	synthetic corticosteroid	RRT	M.W.
RT=20분 이전	1	prednisolone	1	360.2
	2	hydrocortisone	1.051	362.2
	3	betamethasone	1.762	392.2
	4	dexamethasone	1.853	392.2
	5	hydrocortisone 17-acetate	2.133	404.5
	6	triamcinolone acetonide	2.562	434.5
RT=20분 이후	7	clobetasol 17-propionate	1	466.2
	8	prednisolone 21-acetate	0.777	402.5
	9	hydrocortisone 21-acetate	0.817	404.5
	10	triamcinolone diacetate	0.816	478.5
	11	prednisone 21-acetate	0.828	400.5
	12	budesonide	0.862	430.2
	13	dexamethasone 21-acetate	0.867	434.5
	14	cortisone 21-acetate	0.834	402.5
	15	betamethasone 21-acetate	0.855	434.5
	16	beclomethasone 21-acetate	0.870	450.95
	17	beclomethasone 17-propionate	0.888	464.98
	18	beclomethasone 21-propionate	0.905	464.98
	19	hydrocortisone 21-valerate	0.919	446.58
	20	betamethasone 17-valerate	0.947	476.6
	21	hydrocortisone 17-valerate	0.979	446.58
	22	betamethasone 21-valerate	1.008	476.6
	23	betamethasone 17, 21-dipropionate	1.011	504.6
	24	beclomethasone 17, 21-dipropionate	1.092	521

※ 스테로이드 중 beclomethasone 21-hemisuccinate, betamethasone 21-hemisuccinate, dexamethasone 21-hemisuccinate는 피크의 폭이 넓어 RRT를 구하기 어려웠음

## 2) LC-MS/MS 법

정량법 1의 검액을 표준액의 검량선 범위 내에 들도록 메탄올을 넣어 적당한 농도로 희석하여 이를 검액으로 한다. 따로 베클로메타손(beclomethasone), 21-초산베클로메타손(beclomethasone 21-acetate), 17-프로피온산베클로메타손(beclomethasone 17-propionate), 21-프로피온산베클로메타손(beclomethasone 21-propionate), 21-헤미호박산베클로메타손(beclomethasone 21-hemisuccinate), 17, 21-디프로피온산베클로메타손(beclomethasone 17, 21-dipropionate), 베타메타손(betamethasone), 21-초산베타메타손(betamethasone 21-acetate), 17-길초산베타메타손(betamethasone 17-valerate), 21-길초산베타메타손(betamethasone 21-valerate), 21-헤미호박산베타메타손(betamethasone 21-hemisuccinate), 17, 21-디프로피온산베타메타손(betamethasone 17, 21-dipropionate), 부데소니드(budesonide), 17-프로피온산클로베타솔(clobetasol 17-propionate), 21-초산코르티손(cortisone 21-acetate), 텍사메타손(dexamethasone), 21-초산텍사메타손(dexamethasone 21-acetate), 21-헤미호박산텍사메타손(dexamethasone 21-hemisuccinate), 히드로코르티손(hydrocortisone), 17-초산히드로코르티손(hydrocortisone 17-acetate), 21-초산히드로코르티손(hydrocortisone 21-acetate), 17-길초산히드로코르티손(hydrocortisone 17-valerate), 21-길초산히드로코르티손(hydrocortisone 21-valerate), 프레드니솔론(prednisolone), 21-초산프레드니솔론(prednisolone 21-acetate), 21-초산프레드니손(prednisone 21-acetate), 트리암시놀론아세토니드(triamcinolone acetonide), 초산트리암시놀론(triamcinolone diacetate), 디클로리손 아세테이트(dichlorisone acetate)의 200 ppm 표준원액을 각각 취하여 메탄올을 넣어 1 ppm으로 하여 각 스테로이드 물질의 질량분석법 조건을 확립하기 위한 표준액으로 한다. 따로 각 200 ppm 표준액 1 mL를 취하여 합하고 메탄올을 넣어 50 mL로 하여 혼합표준액 4 ppm을 만들고 이를 취하여 메탄올을 넣어 50, 100, 250, 500 ppb 혼합표준액으로 한다.

검액 및 표준액 2  $\mu$ L를 가지고 다음의 조건으로 액체크로마토그래피-질량분석법의 검량선법에 따라 시험하여 검액 중 스테로이드의 양을 구한다.

### < UPLC 조작조건 >

사용기기 : UPLC-MS/MS(Triple Q)

칼럼 : Acquity UPLC<sup>®</sup> BEH C18 (2.1 x 100 mm, 1.7  $\mu$ m)

이동상 : A - 0.1% formic acid in 95% 물과 5% 아세토니트릴 혼합액

B - 0.1% formic acid in 5% 물과 95% 아세토니트릴 혼합액

유량 : 0.25 mL/min

이동상의 농도구배 및 용매조성

시간(분)	이동상 A(%)	이동상 B(%)
0	80	20
3	80	20
13	40	60
17	0	100
20	0	100
20.5	80	20
25	80	20

< 질량분석기 조작조건 >

사용기기 : XEVO-TQMS

Ion source : Positive mode

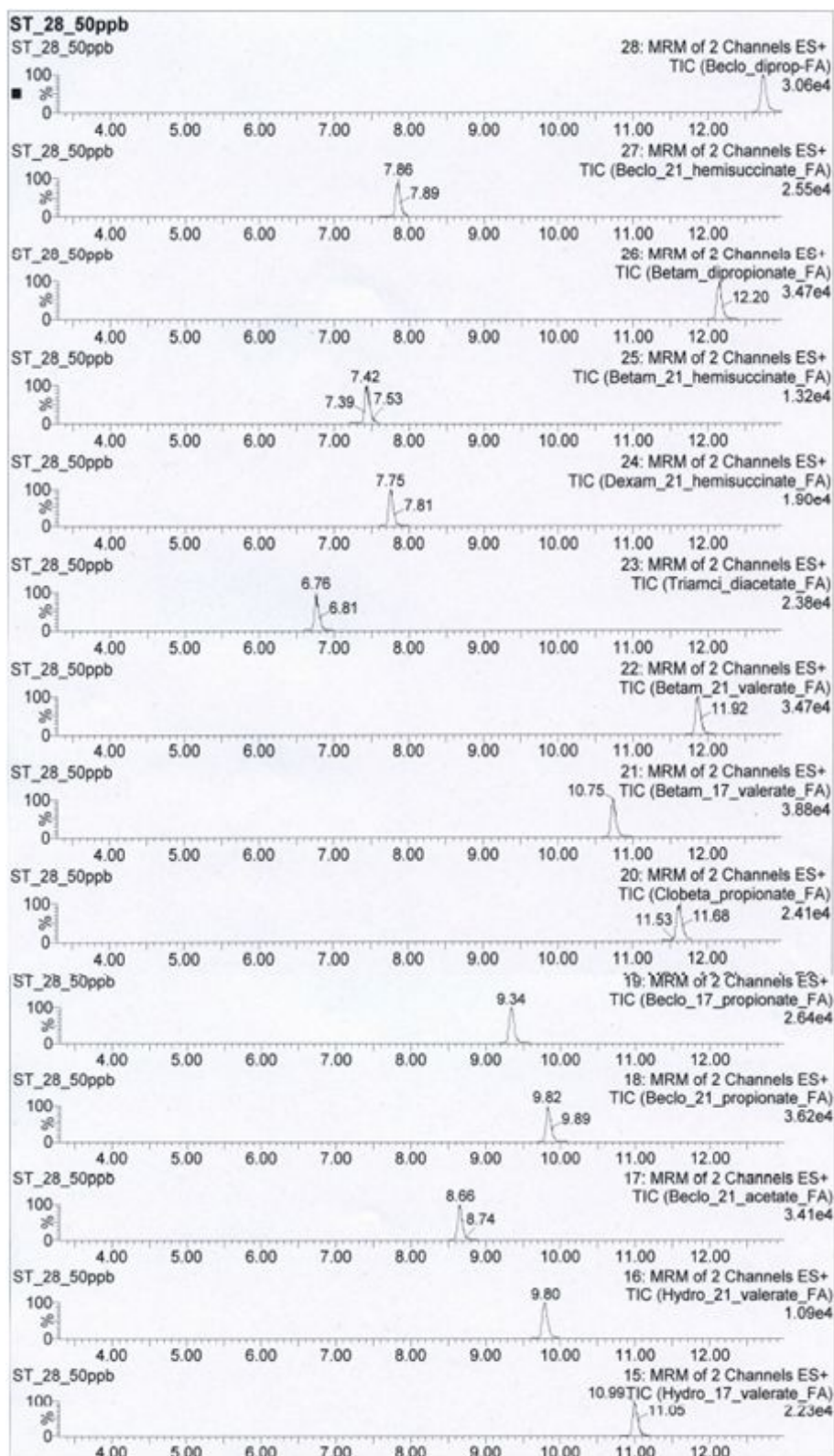
검출조건

성분명	Molecular weight	[M+H] <sup>+</sup> ion	Cone Voltage	Product ions	Collision Energy
beclomethasone	408.17	409.1	20	391.05	10
		409.1	20	373.03	8
beclomethasone-21-acetate	450.18	451.02	20	433.07	12
		451.02	20	319.09	16
beclomethasone-17-propionate	464.20	465.03	22	447.02	10
		465.03	22	355.06	12
beclomethasone-21-propionate	464.20	465.03	16	447.02	12
		465.03	16	319.09	20
beclomethasone-21-hemisuccinate	508.19	590.02	18	491.02	12
		509.02	18	319.08	16
beclomethasone-dipropionate	520.22	521.06	18	503.05	10
		521.06	18	319.08	16
betamethasone	392.20	393.10	20	373.12	8
		393.10	20	279.07	18
betamethasone-21-acetate	434.21	435.11	18	415.08	8
		435.11	18	279.08	14
betamethasone-17-valerate	476.26	477.09	20	355.10	10
		477.09	20	457.13	8
betamethasone-21-valerate	476.26	477.09	18	457.13	8
		477.09	18	439.12	10
betamethasone-21-hemisuccinate	492.22	493.05	18	455.02	10
		493.05	18	475.56	8
betamethasone-dipropionate	504.25	505.09	20	411.08	10
		505.09	20	485.07	10
budesonide	430.24	431.07	22	413.12	10
		431.07	22	323.11	16
clobetasol-17-propionate	466.19	467.03	22	373.06	10
		467.03	22	447.01	6
cortisone-21-acetate	402.20	403.10	36	163.05	28
		403.10	36	343.07	18

성분명	Molecular weight	[M+H] <sup>+</sup> ion	Cone Voltage	Product ions	Collision Energy
dexamethasone	392.20	393.10	20	373.12	8
		393.10	20	355.11	10
dexamethasone-21-acetate	434.21	435.11	16	415.08	6
		435.11	16	309.13	12
dexamethasone-21-hemisuccinate	492.22	493.05	18	337.11	14
		493.05	18	455.07	10
hydrocortisone	362.21	363.10	32	327.10	14
		363.10	32	309.098	18
hydrocortisone-17-acetate	404.22	405.12	28	327.13	14
		405.12	28	345.15	12
hydrocortisone-21-acetate	404.22	405.06	32	309.12	16
		405.06	32	327.13	18
hydrocortisone-17-valerate	446.27	447.10	34	327.10	18
		447.10	34	309.08	18
hydrocortisone-21-valerate	446.27	447.10	26	345.12	14
		447.10	26	327.10	18
prednisolone	360.19	361.09	18	343.10	8
		361.09	18	325.10	12
prednisolone-21-acetate	402.20	403.10	20	385.10	10
		403.10	20	307.10	14
prednisone-21-acetate	400.19	401.08	24	383.10	10
		401.08	24	313.10	12
triamcinolone acetonide	434.21	435.11	22	415.08	8
		435.11	22	397.07	14
triamcinolone diacetate	478.20	479.04	20	441.07	10
		479.04	20	459.08	8
dichlorisone acetate	454.13	455.10	19	237.15	21
		455.10	19	419.24	11

- ※ MS의 confirmation method 수행 결과 표준액·검액 간 해당 peak의 relative abundance ratio 편차가 5 % 이하임.
- ※ MRM 조건은 기기 상태 및 용매 조건에 의해 변경 가능함.
- ※ 정량한계 : 50 ppb
- ※ 본 기기 미보유시 유사한 기기를 사용하여 분석할 수 있음(단, MS confirmation method로 확인 요함)

[표준액 MRM TIC]



[표준액 MRM TIC(계속)]

