

Matrix-assisted Laser Desorption / Ionization Time-of-flight Mass Spectrometry 를 이용한 화장품에서의 계면활성제 분석

이명희, 최종근*, 이보섭*, 김상진

대전보건대학 화장품과학과

* ㈜ 태평양 기술연구원

요 약

화장품, 의료용, 가정용품 및 공업용제품에까지 광범위한 용도로 사용량이 많은 중요한 비이온 계면활성제의 종류 중에서 polyoxyethylene(POE) 부가형 계면활성제의 경우 그 부가몰수에 따라 특성이 달라지고 용도가 다르게 사용된다. 이때 부가된 분자들의 분자량이 크고 분포를 이루는 혼합물이기 때문에 분석이 매우 어렵다. 따라서 MALDI-TOF/MS 방법을 이용하여 이들의 분자량과 그 분포를 측정함으로써 쉽고 빠르게 측정할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 이 논문에서는 화장품에 주로 사용되는 비이온 계면활성제를 선택하여 MALDI-TOF/MS 를 측정하여 스펙트럼으로부터 분자량 분포와 POE 부가정도를 측정할 수 있었다. 그리고 이 조건을 적용하여 시중에 판매되는 제품에서 추출된 비이온 계면활성제의 MALDI-TOF/MS 스펙트럼으로부터 분자량 분포와 POE 부가 정도를 확인 할 수 있었다.

서 론

비이온 계면활성제는 주로 세정, 유화, 침투, 기포의 목적으로 화장품, 의료용, 가정용품 및 공업용제품에까지 광범위하게 이용되며 그 사용량이 많은 중요한 계면활성제이다. 비이온 계면활성제는 그 구조에 따라 ether, ester, amide 형으로 분류된다. 또한 polyoxyethylene(POE) 부가형과 비 POE 부가형으로 분류할 수 있다. 이중 POE 부가형 계면활성제는 화장품에 많이 사용되나 분자량이 크고 일정 크기의 분포를 이루는 혼합물이기 때문에 분석이 매우 어렵다.

지금까지 비이온 계면활성제의 정성분석법으로는 일반적으로 IR 법, TLC 법, 화학시험법, NMR 법등이 알려져 있다. 그러나 이들 방법으로는 계면활성제의 화학적 계열을 알 수는 있으나 그 분자량 분포나 POE 계열의 EO 부가 정도를 확인하는 것이 불가능하다. TLC 또는 HPLC 법으로 간단한 비이온 계면활성제의 조성에 관한 정보를 얻는 것이 알려져 있기는 하나, 조성이 복잡하고 분자량이 큰 경우에는 한계가 있다. 또한 GC 및 GC-MSD 를 이용하는 방법은 직접 또는 TMS 화에 의한 분석이 가능하지만 EO 의 부가 몰수가 큰 경우나 비휘발성 성분에는 적용이 곤란하다. 따라서 본 연구에서는 MALDI (matrix assisted laser ionization)-TOF Mass 방법을 이용하여 신속하고 정확하게 화장품에 흔히 사용되는 POE 부가형 계면활성제들의 분자량 분포를 측정하고 이로부터 EO 부가의 정도를 확인하는 분석법을 확립하고자 하였다.

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI) 이온화 방법

MALDI 법에서는 이온화를 촉진하는 시약으로서 매트릭스(matrix)라고 하는 일련의 화합물을 사용한다. 매트릭스(figure 3)는 sample 과 함께 용매에 녹여 용매의 증발과 함께 sample 을 이온화 시킨다. Figure 1 에 이온화 개념을 나타내었다. 이 이온화법의 구조는 아직 완전히 설명되지 않았지만 전체적으로 다음과 같은 방법으로 진행되리라 유추되고

있다.

1. 우선 laser 광선을 받아서 matrix 분자는 공명 흡수되어 여기상태가 된다.
2. 여기상태로 된 matrix로부터 얻어진 에너지에 의해서 sample 은 순간적으로 증발한다.
3. 진공 증발된 상태에서 sample 은 기상반응(proton 이동)등에 의해서 이온화 된다.

즉 이 방법은 시료를 매트릭스로 희석시켜 시료가 직접 레이저 빛에 노출되지 않은 상태에서 이온화시키는 방법이다. 레이저를 매트릭스와 시료 혼합 결정에 조사하면 매트릭스는 고체에서 기체로 상 변화가 일어나며 동시에 탈착-이온화를 일으킨다. 이때 매트릭스 속에 존재하던 시료도 함께 상 변화를 일으키고, 주변의 매트릭스와 충돌에 의한 운동에너지와 양성자의 전이에 의해 이온화가 이루어진다. 이때 매트릭스가 먼저 레이저의 분해되지 않은 상태에서, 양성자 전이에 의해 이온화가 일어나므로 비교적 분자량이 큰 화합물도 이온화가 가능하다. 그 결과 열적 불안정성과 비휘발성 분자량을 측정할 수 있는 새로운 ‘연성 이온화 (Soft Ionization)’ 방법으로 각광을 받게 되었다.

MALDI 방법의 특징은 시료 용액을 매트릭스 용액과 혼합하고, 용매를 건조시켜 결정을 만든 후, 이온화시키는 것이다. 따라서 매트릭스와 함께 결정을 형성하는 시료는 MALDI 를 이용하여 분자량을 측정할 수 있다. MALDI 방법에 영향을 주는 요인은 매트릭스의 종류, 레이저의 세기 그리고 결정 상태이다. 매트릭스는 시료의 극성이 기체 상태에서의 매트릭스-시료 간의 양성자 전이 반응에 영향을 미치기 때문에, 시료의 특성에 맞는 것을 선택하여 해결할 수 있다. 레이저의 세기는 매트릭스의 이온화에 영향을 미치게 된다. 이것은 기계적인 방법으로 세기를 조절함으로써 해결되었다. 결정 상태가 중요한 이유는 매트릭스와 시료가 균일하게 혼합되어 있는 Co-crystal 을 형성해야 결정 전체에서 효율적으로 이온화가 이루어지기 때문이며, 용매의 증발속도에 큰 영향을 받는다. 따라서 용매를 건조시키는 방법에 의해 여러 가지 시료 제작법이 개발되었으며, 자연 건조(Air Dry), 열 건조(Hot Dry), 진공 건조(Vacuum Dry) 등의 방법이 보고 되어 있다.

Time of Flight (TOF) MS

TOF MS(비행 시간형 질량 분석기기)의 간략한 개요를 Figure 2에 나타내었다. 이온화된 sample은 가속전압에 의해 운동에너지를 갖게 되어 높은 진공의 flight tube 내에서 자유비행을 시작한다. Flight tube의 반대측에는 MCP(micro channel plate) detector가 설치되어 있다. 이 detector에 분자량이 낮은 분자가 먼저 도달하고, 분자량이 높은 분자는 나중에 도착하여 이에 따른 분리가 이루어지고 detector까지의 도달 시간을 측정하는 것에 의해 분자량이 결정된다. 분자량의 결정은 다음 식으로 표시된다.

t = 분자의 비행시간

s = 비행거리 (flight tube의 길이)

m = 분자의 질량

KE = 운동에너지

$$t = s (m/KE)^{1/2}$$

여기에서 s 와 KE를 일정하게 하여 t 의 비행시간을 측정하는 것으로 분자량 m 을 결정할 수 있다.

실 험 방 법

시약

Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입한 *t*-4-hydroxy-3-methylcinnamic acid(ferulic acid, FA), 2-(4-hydroxyphenylazo) benzoic acid(HABA)를 메트릭스로 사용하였으며, 그들의 구조, 분자량 및 녹는점을 Figure 3에 도시하였다. Figure 4에서 나타낸 비이온 계면활성제는 화장품에 주로 사용되고 있는 것으로 선택하였다. 용매로 사용된 Methanol은 Burdick & Jackson사(MI, USA)로부터 구입하였다.

시료준비

HABA 를 매트릭스로 사용하였고, 용매는 메탄올을 사용하였다. 5% 시료용액을 제조하고, 매트릭스는 포화 용액으로 제조하였다. 시료와 매트릭스 용액 각각을 1 μ l씩 취하여 probe 위에 혼합 용직한 후 자연 건조 시켜 결정을 얻었다.

분자량 측정

각 시료의 분자량을 2m 직선형 TOF 질량 분석관이 장착된 MALDI/TOF/MS(Veyager DE-STR)를 이용하여 측정하였다. Power source 로 사용된 파장 337 nm의 N₂ 펄스 레이저는 결정 표면에 5nsec 동안 조사되어 시료를 이온화 시킨다. 시료 분석을 위해 사용되는 sample plate 는 스테인레스 스틸로 제작되었으며, 크기는 약 5 cm 정방형으로 이 plate 위에 sample 과 matrix 를 같이 건조 시켜 결정을 만들며, 이 결정에 레이저를 조사하여 이온을 생성시킨다. 이 MALDI/TOF/MS 는 생체고분자인 단백질 및 유기 합성 고분자의 분자량이 50 ~ 400,000amu 까지 측정할 수 있으며, 분리능은 5735.03amu 를 측정할 때 약 12,600 이다. 예를 들면 분리능 5000 이란 것은, 분자량 5000 과 5001 분자이온이 혼합되어 있는 상태에서도 각각을 식별할 수 있는 능력을 의미한다.

화장품에서 계면활성제 분리 전처리 방법

제품 1 의 전처리

검체 약 1 ~ 3g 을 정밀하게 달아 클로로포름에 녹인 다음 여과지로 여과하여 실리카 겔 (70 ~ 230mesh) 20g 과 무수황산나트륨 10g 으로 미리 충전해 놓은 컬럼에 넣는다. 다음의 용매로 용출한(Fraction 당 50 ml) 다음 드라젠도르프 발색시약으로 발색시켜 POE 부가 계면활성제 fraction 을 확인하여 모아 증발건조 시킨다. 잔류물은 NMR 및 IR 을 측정하여 정성하고 그 무게를 측정하여 POE 부가 계면활성제를 정량한다.

1. 클로로포름 200 ml
2. Ethylacetate/Chloroform 혼합액(1:99) 100 ml

- | | |
|-------------------------------------|--------|
| 3. Ethylacetate/Chloroform 혼합액(1:1) | 100 ml |
| 4. Acetone/Chloroform 혼합액(1:1) | 100 ml |
| 5. Methanol/Chloroform 혼합액(5:95) | 100 ml |
| 6. Methanol/Chloroform 혼합액(1:9) | 100 ml |
| 7. Metanol/Chloroform 혼합액(1:2) | 100 ml |

제품 2 의 전처리

건조 잔분, 강열 잔분, NMR 그리고 GC 분석결과 1,3-BG, Zeolite, PEG, 소량의 Silicone 등이 검출됨에 따라 PEG 만 분리하기 위하여 먼저 105 도에서 충분히 건조하여 1,3-BG 를 제거하였다. 잔류물에 에탄올을 넣어 분산 시키고 여과지로 여과하여 Zeolite 역시 제거 하고 증발 건조하여 PEG 를 분리하였다.

실험 결과 및 고찰

화장품원료로 사용되는 계면활성제의 분석

매트릭스는 시료의 이온의 생성에 큰 영향을 미친다. 따라서 분석 하고자 하는 시료에 따라 알맞은 매트릭스를 찾는 것이 중요하다. 일반적인 MALDI 분석에서 ferulic acid, DHB, HABA 와 CHCA 같은 유기산이 매트릭스로 사용되는 이유는 이들이 자외선을 잘 흡수하며, 쉽게 수소 양이온을 내어 놓을 수 있기 때문이다. DHB 와 HABA 는 주로 비극성이거나 약간 극성을 띠는 합성 화합물, 합성 고분자 화합물 등의 분자량을 측정할 경우에 사용된다. 또 CHCA 는 protein, peptide 등의 생체 시료에 대하여 이용되어 진다. Ferulic acid 는 비교적 넓은 범위의 화합물에 적용할 수 있으며, 측정할 수 있는 분자량의 범위도 넓다. 위와 같이 시료의 종류에 따라 사용되는 매트릭스들이 정해져 있는 것은 매트릭스와 시료의 양성자 친화도 차이에 의한 양성자 전달 반응성 때문이다. 따라서 합성 고분자에 해당하는 계면활성제에 알맞은 매트릭스를 찾기 위해, DHB 와 HABA 를

적용시켜 본 결과 HABA 를 사용할 때 그 분자 이온들을 얻을 수 있었다.

분자량이 작은 합성 고분자에 대한 질량 분석법의 장점은 gel permeation chromatography/size exclusion chromatography(GPC/SEC), light scattering 등과 같은 기존의 방법과 비교 하였을 때, 분자량분포를 정확하고 빠르게 측정할 수 있을 뿐만 아니라 반복 단위(repeat unit)와 그 분자량을 쉽게 측정할 수 있다. Figure 4 는 화장품에 사용되고 있는 비이온 계면활성제의 구조를 나타내고 있다. 그림과 같은 구조를 갖는 비이온 계면활성제의 질량 스펙트럼을 매트릭스로 HABA 를 사용하여 자연 건조 시켜 결정을 얻고 질량스펙트럼을 측정할 수 있었다. 우선 figure 5 의 질량 스펙트럼은 HABA 의 질량스펙트럼이다. Figure 5 에서 매트릭스에 양성이온이 결합된 $[M + H]^+$ m/z 243 이온과 탈수된 m/z 226 이온이 확인될 수 있었다. 또한 분자에 Na 가 결합된 m/z 265 와 K 가 결합된 m/z 281 이온이 나타났다. 용매 건조법의 경우 용매를 사용하기 때문에 미량의 Na 와 K 가 포함되어 있어도 아주 쉽게 Na 가 결합된 이온이 질량 스펙트럼에 나타난다.

Figure 6 의 질량스펙트럼은 PEG 400 의 스펙트럼으로 $[M + H]^+$ 과 $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$ 이온을 확인할 수 있으며 $[M + Na]^+$ 이온이 가장 큰 세기로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 그리고 분자량 분포와 반복 단위를 분자량 피크 차이를 계산함으로써 알 수 있다. 그 결과는 Table 1 에 정리하여 나타내었다.

Figure 7, figure 8 과 figure 9 의 질량스펙트럼은 Tween 20(polysorbate 20), Tween 60 (polysorbate 60)과 Tween 80(polysorbate 80)의 스펙트럼으로 분자 이온들을 확인할 수 있고, 그 분자량 분포와 반복 단위를 알 수 있었다. 역시 그 결과는 Table 1 에 정리하여 나타내었다. Tween 계열은 그 대표적인 구조를 figure 4 에서 볼 수 있는 sorbitol ester 화합물과 anhydride 화합물의 부가 고분자 화합물로 이루어져 있음을 확인할 수 있었다. 즉 분자량 분포가 두개 이상의 봉우리를 이루며 나타나는 것을 확인할 수 있다. 그 분포가 서로 다르므로 같은 계열간의 구분도 가능함을 알 수 있다.

Figure 10 과 figure 11 의 질량스펙트럼은 Myrij 52(PEG 40 stearate), Myrij 59(PEG 100 stearate)의 스펙트럼으로 분자 이온들을 확인할 수 있고, 분자량 분포와 반복 단위를 알

수 있었다. 그 결과는 Table 1 에 정리하여 나타내었다. 역시 같은 계열 뿐만 아니라 다른 계면활성제와의 구분이 가능함을 알 수 있다.

Figure 12 는 Brij 35(Laureth 23)의 질량 스펙트럼이다. 이 화합물은 lauryl alcohol 에 ethyleneglycol 이 추가된 ether 형태의 계면활성제로 그 구조를 figure 4 에서 볼 수 있다. 이 고분자 화합물의 분자량과 그 분포 그리고 반복 단위를 확인 할 수 있었고, 그 결과를 Table 1 에 나타내었다.

화장품 중에 사용된 계면활성제의 확인

제품 1 에서 추출되어진 계면활성제는 NMR 스펙트럼 분석결과 0.8ppm 위치에 triplet (CH₃ peak) 형태의 피크, 1.2ppm 의 multiplet(CH₂ peak), 3.6ppm 의 broad 한 silglet(POE peak)이 나타난 것으로 보아 alkyl ether type 의 계면활성제임을 확인 할 수 있고, figure 13 에서 그 분자량 분포가 500-2800 이며 POE 부가 정도가 약 10-40 몰 정도임을 확인할 수 있다.

제품 2 에서 추출되어진 계면활성제는 NMR 분석결과로부터 3.6ppm 위치에 broad 한 silglet 만 나타나는 것으로 보아 PEG 계열의 계면활성제임을 확인 할 수 있으나 이것의 분자량 분포는 알기가 어렵다. 따라서 그 분자량 분포를 figure 14 에서 확인 할 수 있고 이것이 PEG 400 과 일치하는 분자량 분포를 나타내는 것을 쉽게 확인 할 수 있다.

결 론

위와 같은 결과로부터 계면활성제의 분석에 MALDI-TOF/MS 를 이용하여 분자량 분포와 반복 단위등에 대한 상세한 정보를 쉽고 빠르게 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 화장품 원료 중에 계면활성제의 MALDI-TOF/MS 를 이용하여 얻은 질량 스펙트럼을 library 와 비교 하고 제품 중에서 계면활성제를 분리하여 스펙트럼을 측정하여 그 분포 및 반복 단위 및 분자량을 확인함으로써 쉽게 계면활성제를 정성할 수 있는 유용한 방법으로

이용될 수 있음을 알 수 있다. 앞으로 진행되어질 실험은 더 많은 계면활성제 및 고분자의 MALDI-TOF/MS 스펙트럼을 얻을 수 있는 실험적인 조건을 결정하고 이를 원료 및 제품 중에서의 정성에 응용하고자 한다. 따라서 MALDI-TOF/MS 의 새로운 분석 방법이 화장품 원료의 품질관리 및 특수한 고분자 및 계면활성제가 사용된 특수한 제형의 제품에서 고분자 및 계면활성제의 정성 방법으로 간편하게 이용되리라 기대된다.

참 고 문 헌

1. 최신향장품분석
2. R. Beavis, B. Chait, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* , **3**, 432(1987)
3. R. Beavis, B. Chait, *ibid*, **3**, 233(1989)
4. R. J. Cotter, *Anal. Chim. Acta*, **195**, 45(1987)
5. Akos Vertes, Gy rgy Irinyi, Renaat Gijbels, *Anal. Chem.*, **65**, 2389(1993)
6. M. Karas, F. Hillenkamp, *Anal. Chem.* , **63**, 1193A(1991)
7. James A. Blackedge, Anthony J. Alexander, *Anal. Chem.* , **67**, 834(1995)
8. Steven L. Cohn, Brian T. Chait, *Anal. Chem.*, **68**, 31(1996)
9. Ole Vorm, Peter Roepstorff, Matthias Mann, *Anal. Chem.* , **66**, 3281(1994)
10. K. strupat, M. Karas, R. Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processs,al.*, **111**, 89(1991)
11. R. C. Beavis, J. N. Bridson, *J. Phys.*, **26**, 442(1993)
12. Giorgio Montaudou, Maurizio S. Montaudou, Conetto Puglisi and Filippo Samperi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1158(1995)
13. Giorgio Montaudou, Maurizio S. Montaudou, Conetto Puglisi and Filippo Samperi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **8**, 1011(1994)

시료의 종류	분자량 분포	반복 단위 (repeat unit)	부가물 및 분포의 형태
1. PEG 400	300 ~ 800	44	Polyoxyethylene(POE) 부가물, Monodispersion
2. Tween 20	300 ~ 800 : 900 ~ 2000 = 1:1 (피크의 세기)	44	POE 부가물, polydispersion
3. Tween 60	400 ~ 800 : 900 ~ 2500 = 1:4	44	POE 부가물, polydispersion
4. Tween 80	500 ~ 1100:1200 ~ 2500 = 1:1	44	POE 부가물, polydispersion
5. Myrij 52	1200 ~ 3000	44	POE 부가물, monodispersion
6. Myrij 59	500 ~ 5000	44	POE 부가물 3000 - 5000 부근에서 gaussian shape
7. Brij 35	600 ~ 2000	44	POE 부가물, monodispersion

Table 1. 비이온 계면활성제의 분자량 분포 및 반복단위 그리고 분포 형태

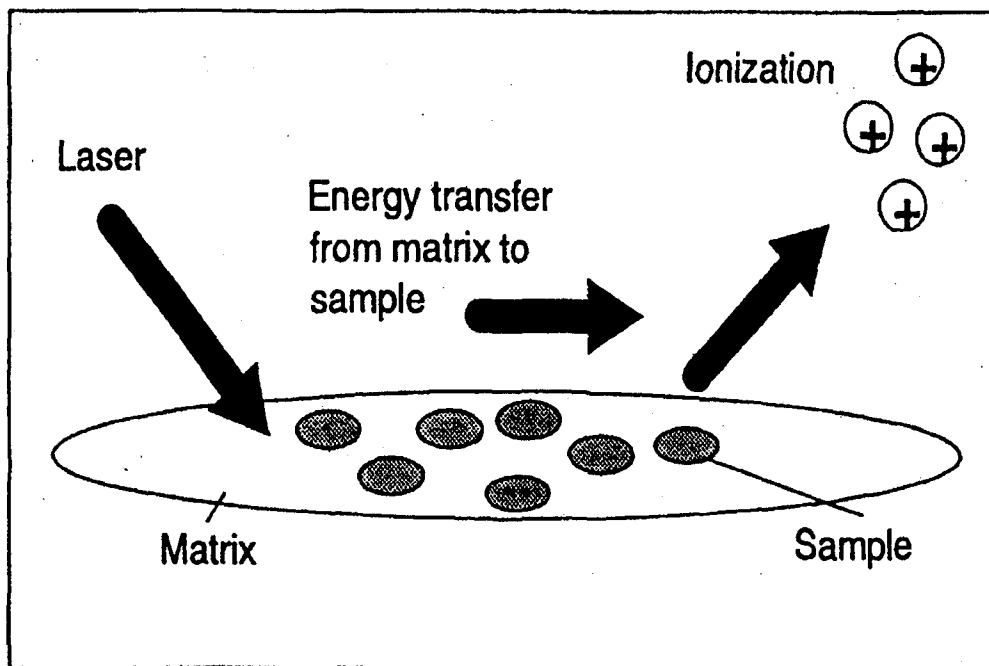


Figure 1. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization

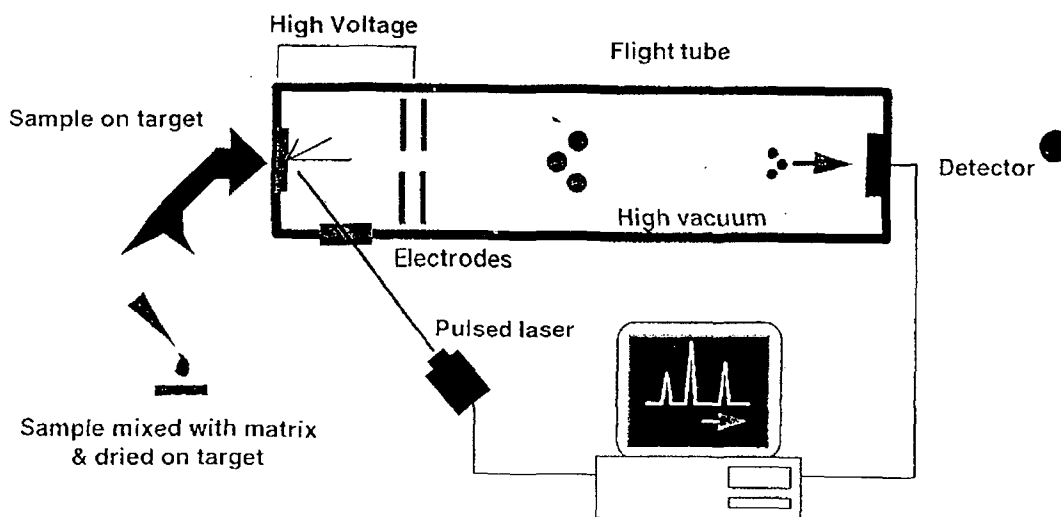
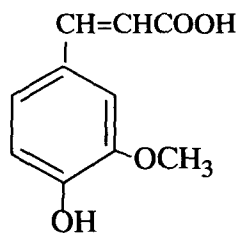


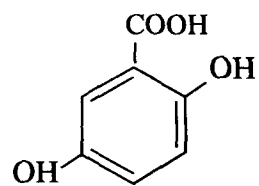
Figure 2. Outline of MALDI-TOF/MS



Ferulic acid (FA)

(*t*-4-Hydroxy-3-methoxycinnamic acid)

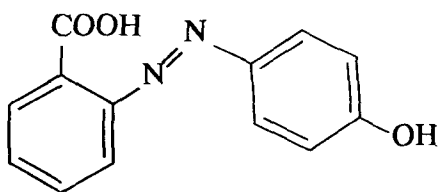
C₁₀H₁₀O₄ : 194.19 mp : 168 ~ 171 °C



DHB

(2,5-Dihydroxybenzoic acid)

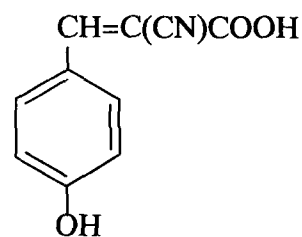
C₇H₆O₄ : 154.12 mp : 205 °C



HABA

(2-(4-Hydroxyphenylazo) benzoic acid)

C₁₃H₁₀N₂O₃ : 242.23 mp : 205 ~ 171 °C

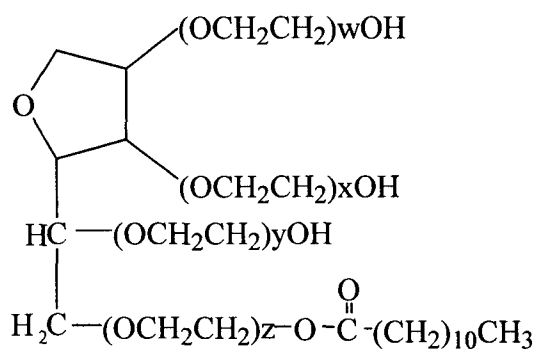


CHCA

(α -cyano-4-hydroxycinnamic acid)

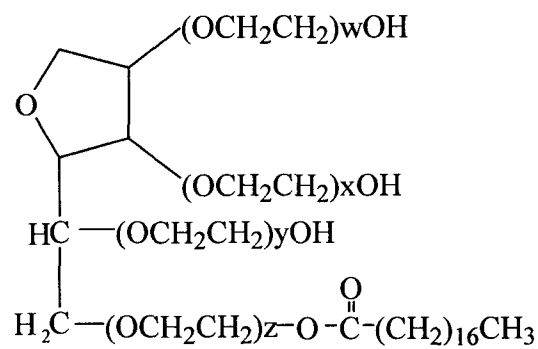
C₁₃H₁₀N₂O₃ : 242.23 mp : 205 ~ 171 °C

Figure 3. Structure of matrixs



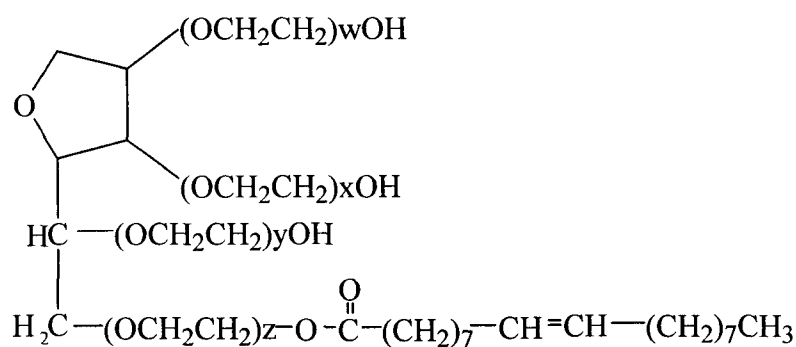
Tween 20 (polysorbate 20)

$$w + x + y + z = 20$$



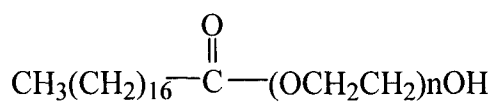
Tween 60 (polysorbate 60)

$$w + x + y + z = 20$$

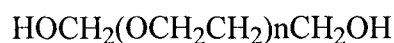


Tween 80 (polysorbate 80)

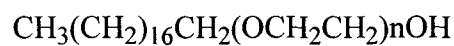
$$w + x + y + z = 20$$



Myrj 52 (PEG-40-stearate n = 40), Myrj 59 (PEG-100-stearate n = 100)



PEG 400



Brij 35 (Laureth-23 n = 23)

Figure 4. Structure of non ionic surfactants in cosmetic raw materials

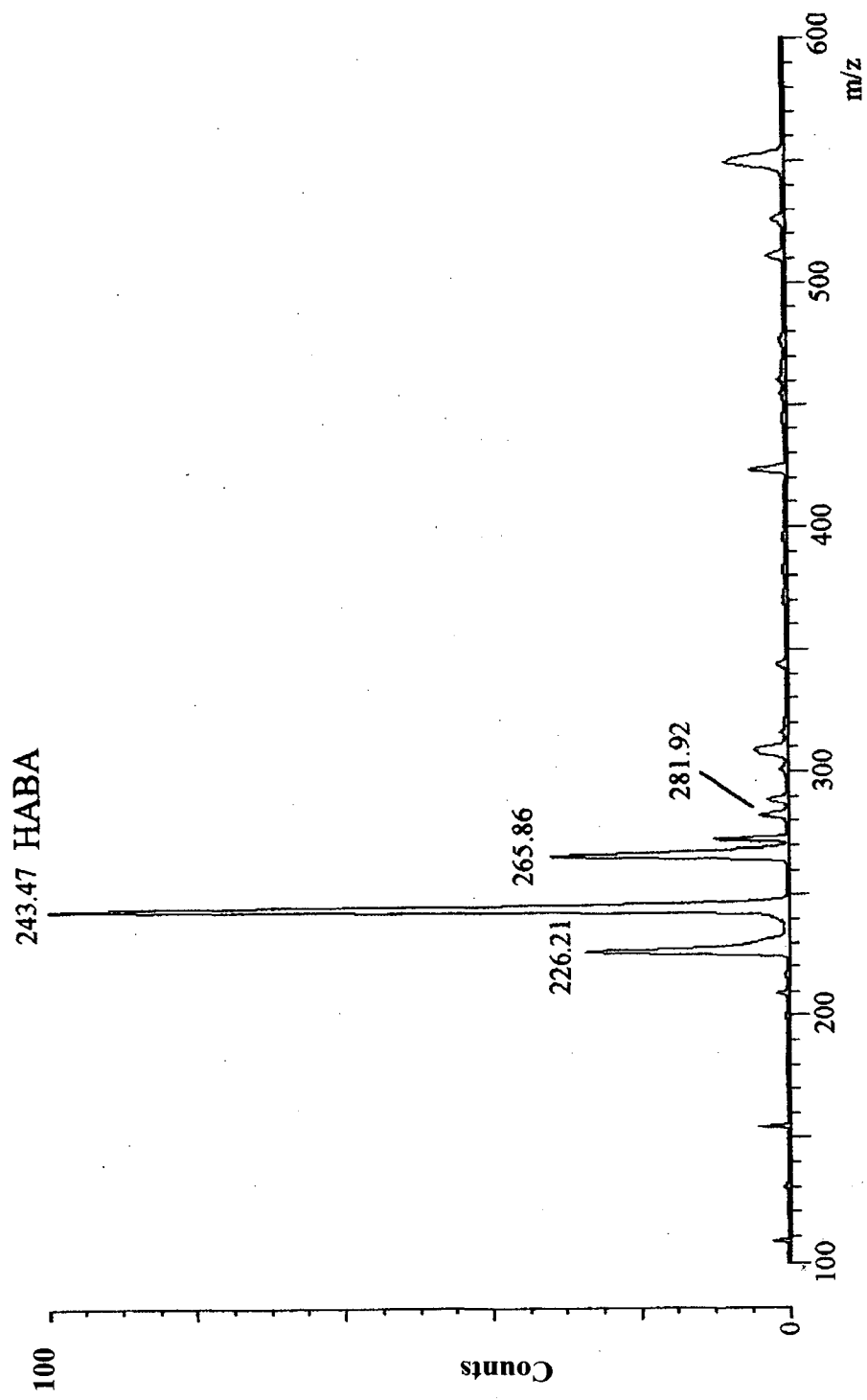


Figure 5. HABA ϕ MALDI mass spectrum

PEG 400

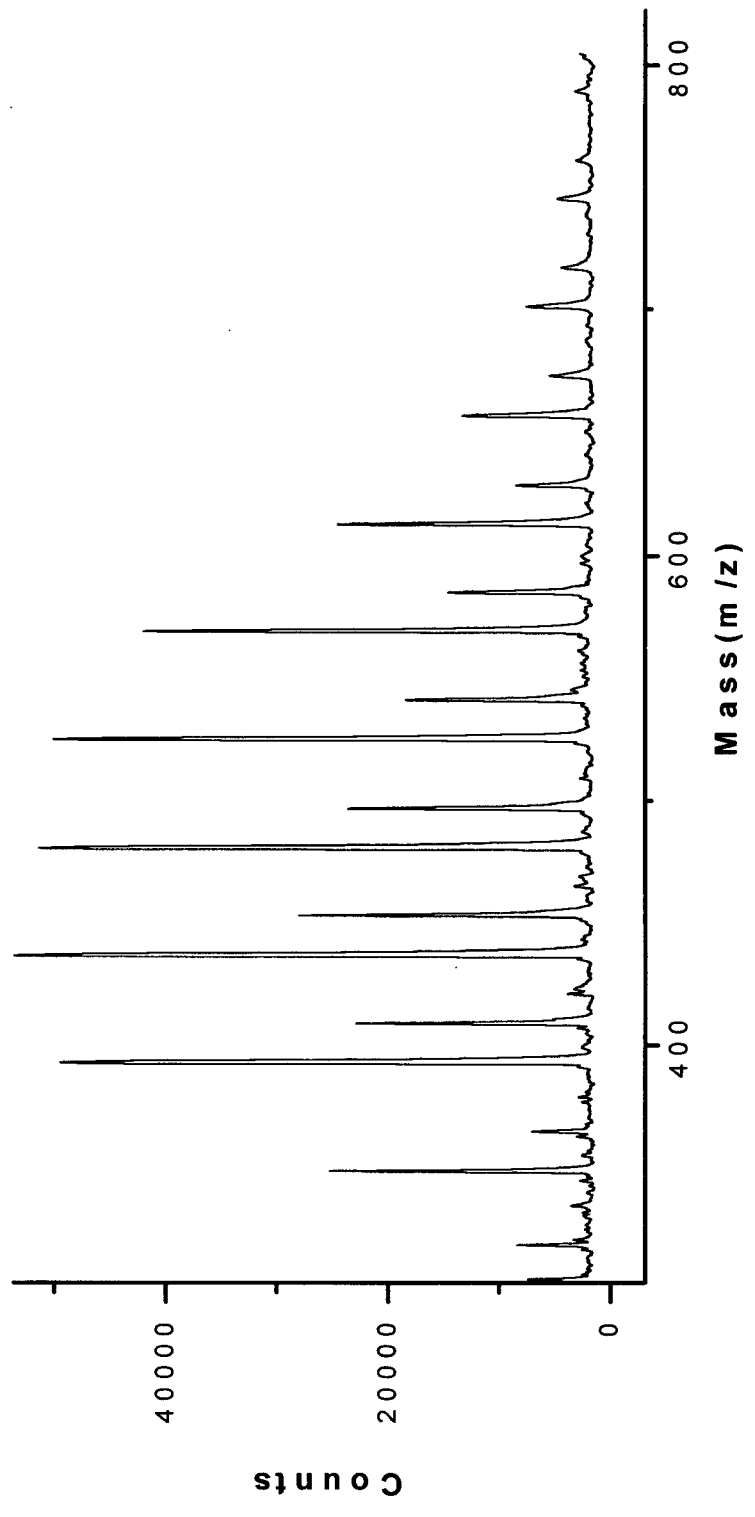


Figure 6. PEG 400 의 MALDI mass spectrum

Tween 20

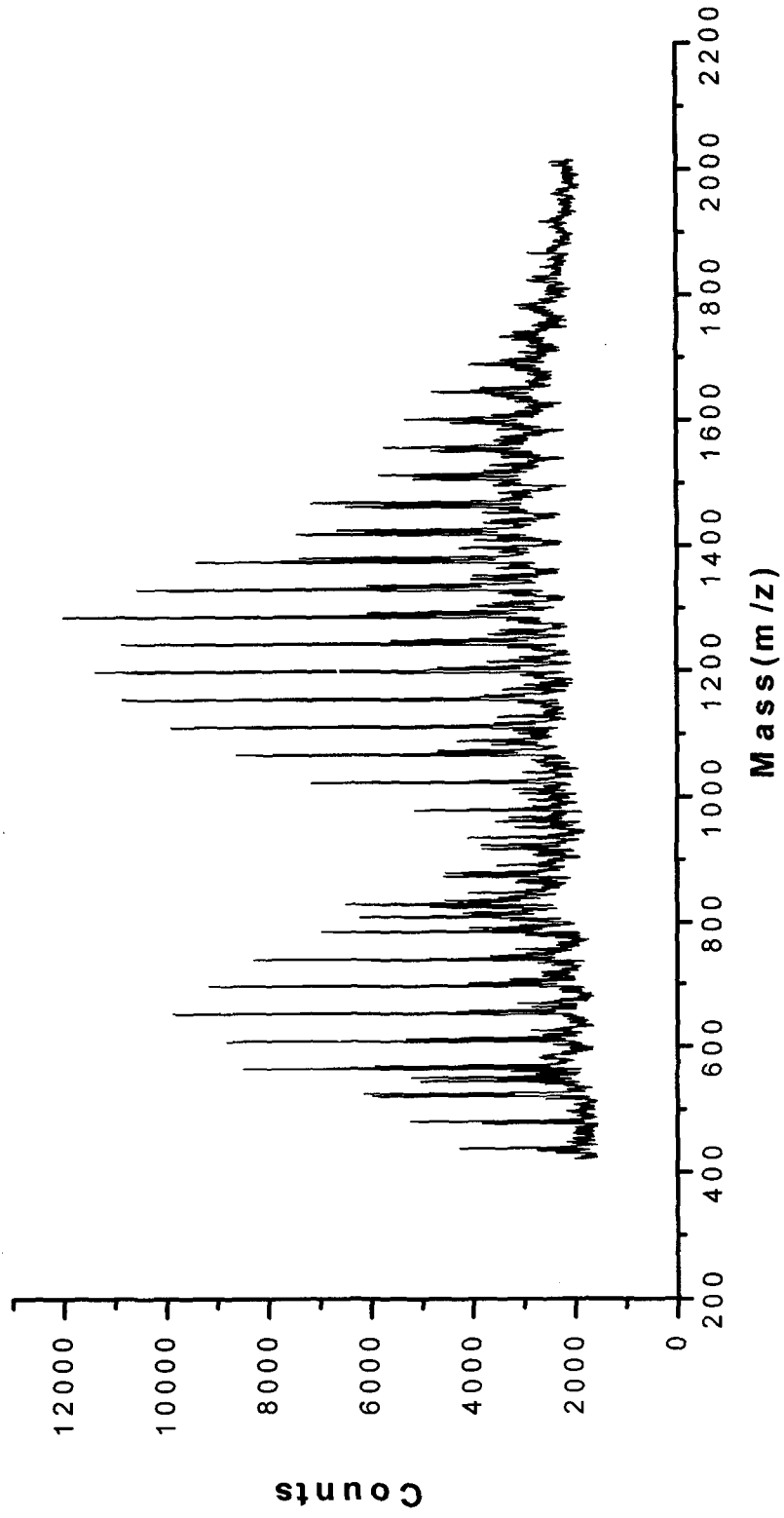


Figure 7. Tween 20 9] MALDI mass spectrum

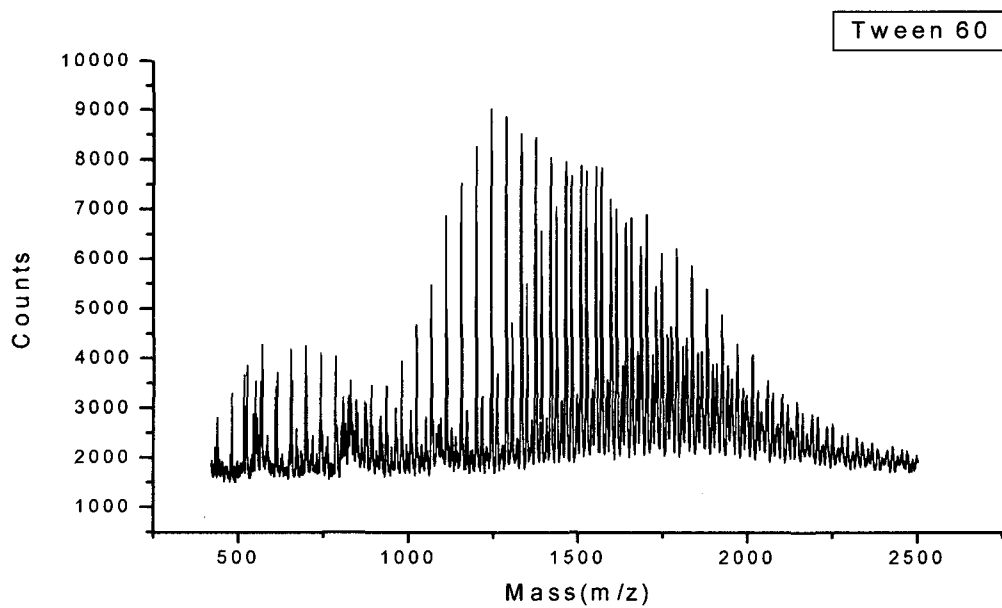


Figure 8. Tween 60 의 MALDI mass spectrum

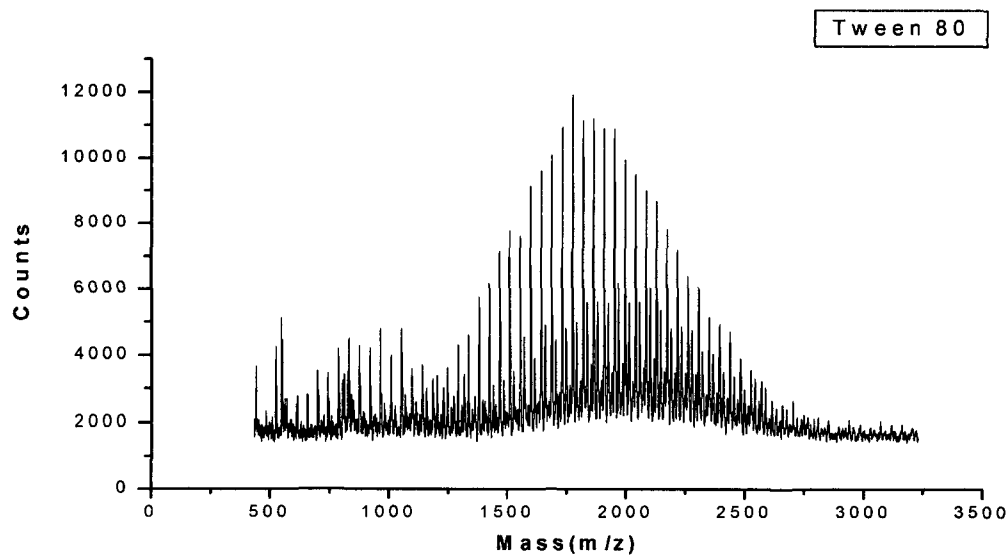


Figure 9. Tween 80 의 MALDI mass spectrum

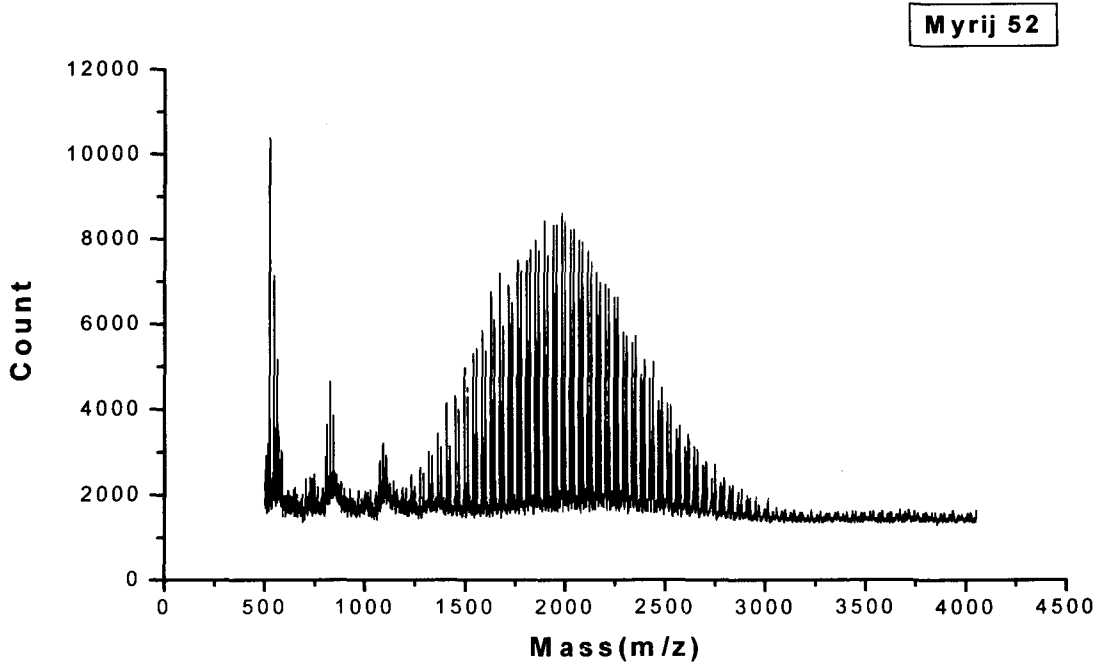


Figure 10. Myrij 52 의 MALDI mass spectrum

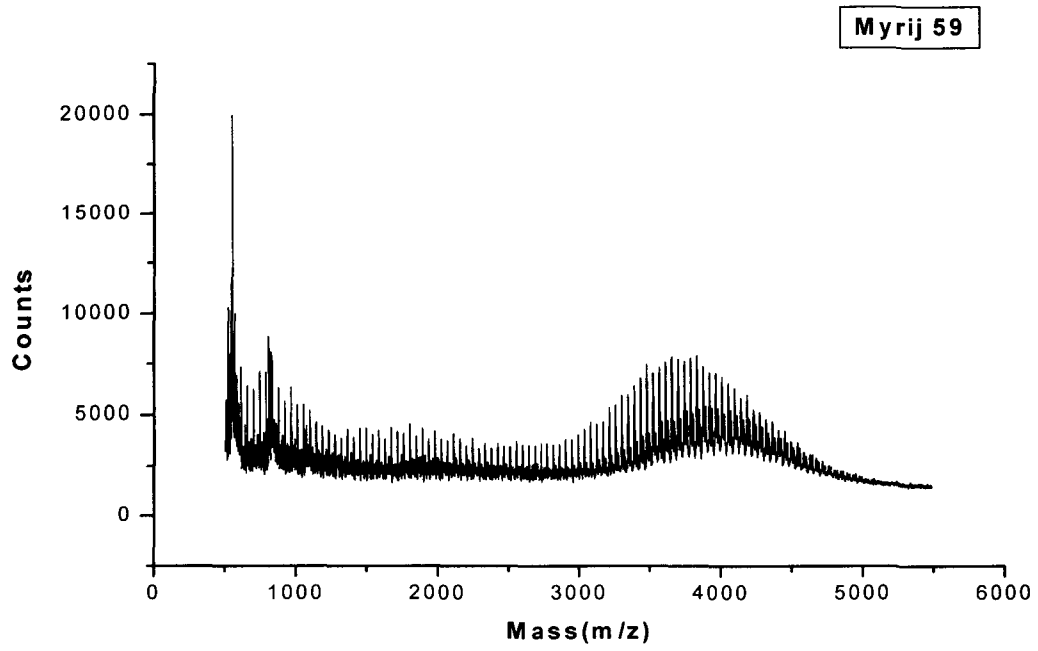


Figure 11. Myrij 59 의 MALDI mass spectrum

Brij 35

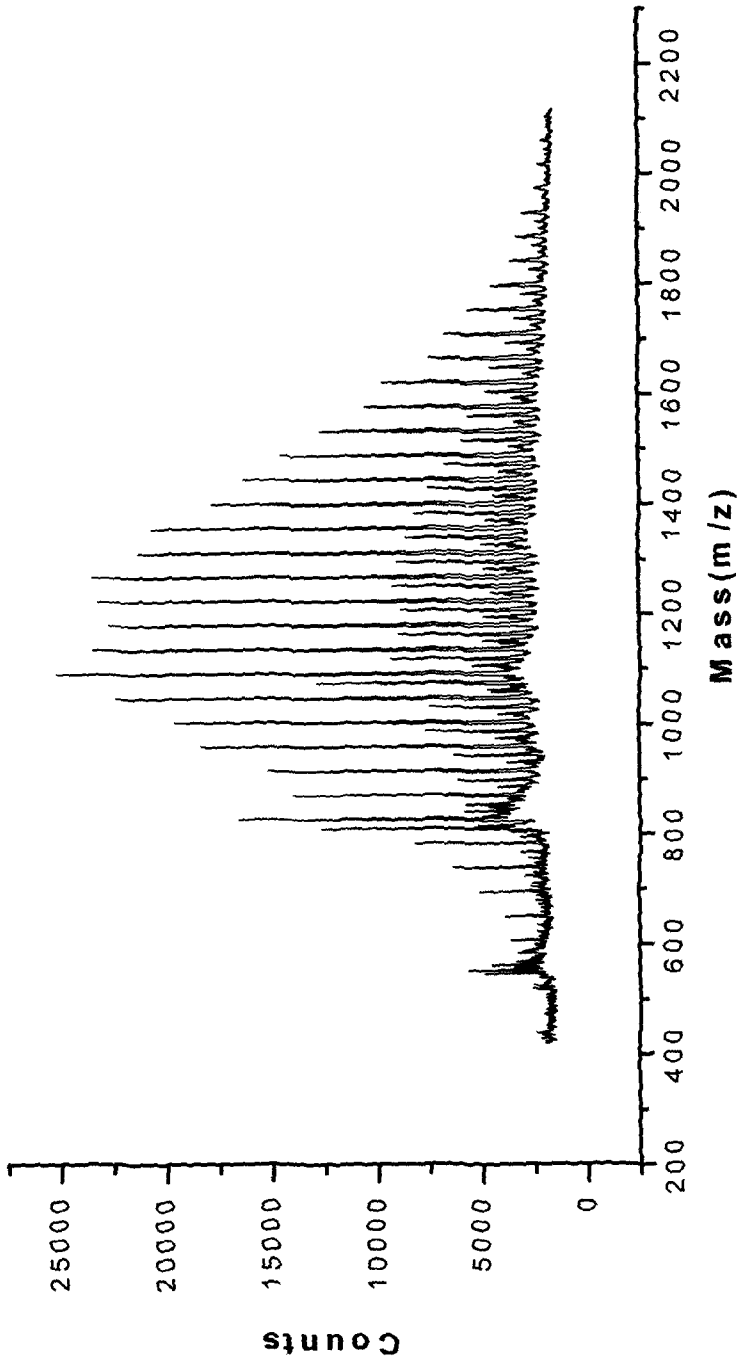


Figure 12. Brij 35 [MALDI mass spectrum

제품 1

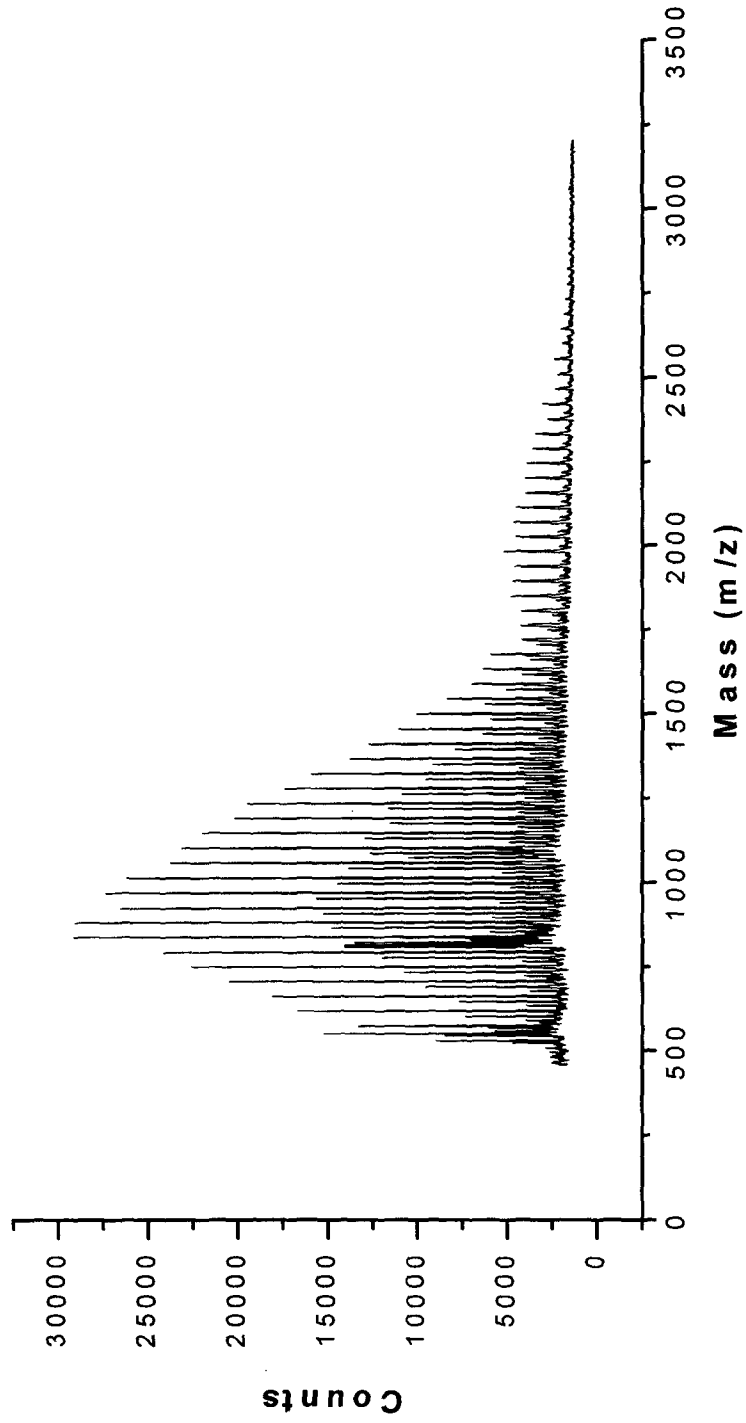


Figure 13. 제품 1 의 ether type 비이온 계면활성제의 MALDI mass spectrum

제품 2

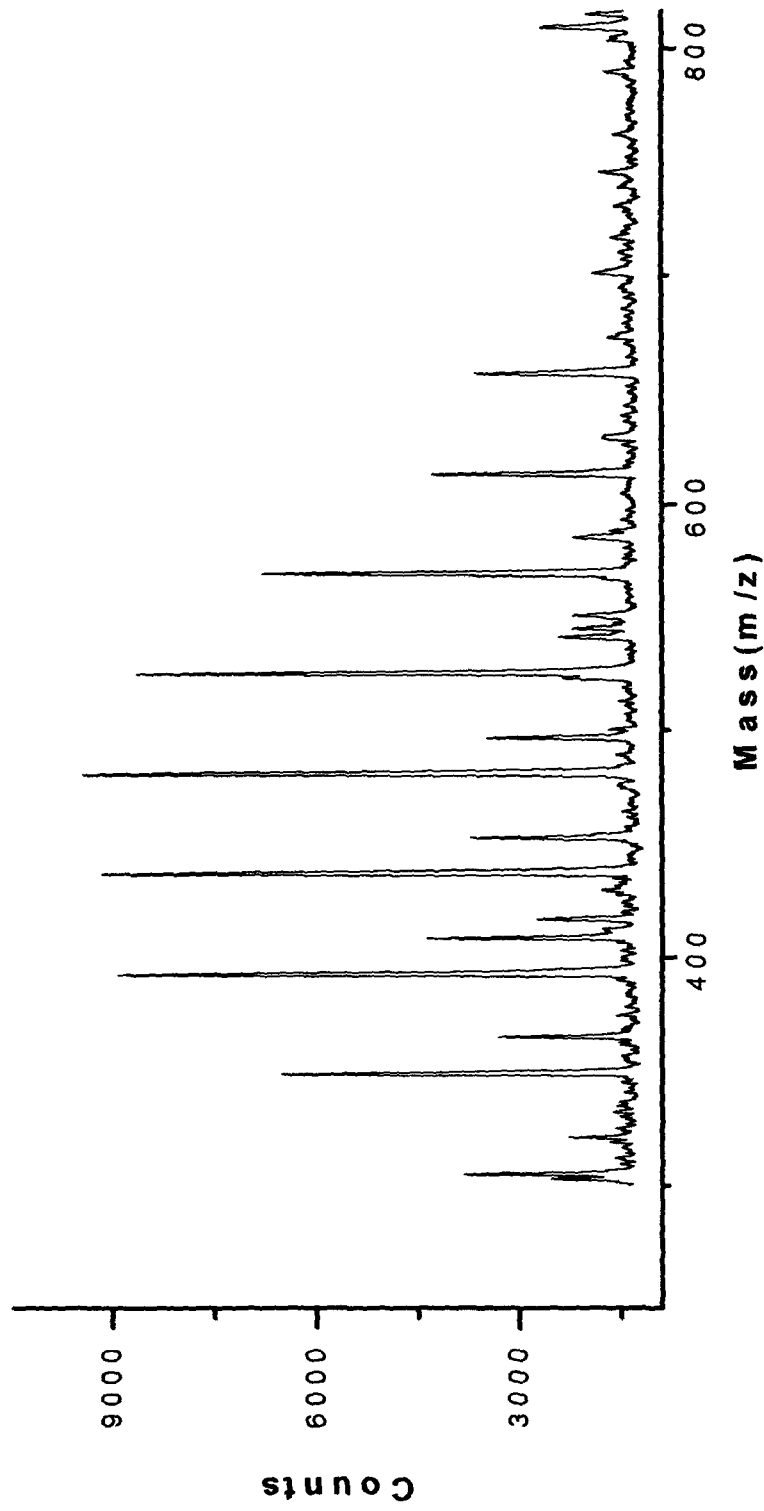


Figure 14. 제품 2 의 PEG 400 MALDI mass spectrum