

HPLC/ELSD에 의한 Mono-, Di- 및 Tri-glycerides류 분석

이만호¹ · 박희구² · 김인환^{3*}

¹경북대학교 응용화학과, ²계명대학교 시스템화학과,
³대구대학교 화학교육과

(2006. 3. 13. 접수, 2006. 6. 1. 승인)

Analysis of Mono-, Di- and Tri-glycerides by high-performance liquid chromatography (HPLC) with evaporative light scattering detection (ELSD)

Man-Ho Lee¹, Heai-Ku Park² and In-Whan Kim^{3*}

¹Department of Applied Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

²Department of Chemical System Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

³Department of Chemistry Education, Daegu University, Kyungsan 712-714, Korea

(Received March 13, 2006; Accepted June 1, 2006)

Abstract : Chromatographic separation of glycerol monostearate, glycerol distearate and glycerol tristearate (GMS, GDS, and GTS) has been performed by normal phase HPLC method utilizing a Zorbax silica (250×4.6 mm, 5 μm) column and hexane-hexane, IPA and ethyl acetate mixtures as the eluent within 20 min. The observed reproducibility was less than 5% RSD, Suggesting that ELSD was an effective tool for detection of the glycerol stearates of low volatility without chromophore. The detection limits were in the concentration range of 0.3~2 mg/L, and the calibration curves (the log-log plots) were linear in the range of 4~1000 mg/L (with the slopes of 1.06~1.32). The application of the analytical procedure without pretreatment demonstrated that the proposed chromatographic method would be practical for a routine analysis of commercial products.

Key words : glycerol monostearate, glycerol distearate, glycerol tristearate, triglycerides, HPLC, ELSD

1. 서 론

Neutral lipid 중으로써 글리세라이드류는 mono-, di- 및 triglyceride로 크게 나뉘어지며, triglyceride는 주요 식용자원으로, mono- 및 diglyceride는 식품 산업에서 널리 사용되는 유허제이다.¹ 따라서 glycerides류에 대

한 정확한 분석 기술은 식품 및 기타 관련 산업에 있어, 제반 품질 측정, 원료 함성, 단가 분석 등에 필수적으로 적용된다. 따라서 neutral lipid 중으로 기본 구조에 속하는 mono-, di- 및 triglyceride 혼합물에서 각 성분을 보다 간편하게 분리분석 할수있는 방법을 연구할 필요가 있다.

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)53-850-6985 Fax : +82-(0)53-850-6989

E-mail: ihkim@daegu.ac.kr

현재까지 가장 광범위하게 사용되는 glycerides류 분석법으로는 GC/FID를 이용하는 분석법이 많이 시도된 바 있다.²⁻⁷ 그러나 GC/FID 분석법은 methylation 등의 방법에 의한 유도체화 조작이 필수적으로 수반되며, 세심한 주의가 요구된다. 한편 90년대 이후 evaporative light scattering detector(ELSD)가 상업화되어 HPLC 검출기로 널리 사용되게 되었다. ELSD는 이동상 보다 휘발성인 물질을 제외하고 대부분의 물질 분석이 가능한 장점을 가지고 있어서 HPLC/ELSD를 이용한 분석에 관한 많은 연구가 보고 되어왔다.⁸⁻¹² HPLC/ELSD법을 이용한 glycerides류 분석에 관하여도 보고되었다.¹³⁻¹⁸ Liu 등은 neutral lipid류를 HPLC/ELSD법을 이용하여 분석하였는데 mono-, diglycerides류에 한정되었다.¹⁷ 또한 Marcato 등은 자유 지방산과 glycerides류의 혼합물을 역상 HPLC/ELSD법을 이용하여 분석하였다.¹⁸ 분석하고자 하는 glycerides는 UV 발색단을 가지지 못하므로 UV 검출기를 적용하기 어려우나, ELSD로는 전처리 조작없이 직접 검출 가능하여 잇점으로 작용한다. 본 연구에서는 검출기로서 ELSD를 이용하여, 유도체화 반응 등 전처리 조작 없이 간편하게 glycerides류 분석이 가능한 순상 HPLC/ELSD 분석방법을 연구 검토하였고, 시중에 유통 중인 triglyceride류 시료 중 diglyceride와 monoglyceride의 함량 분석에 적용하였다.

2. 실험

2.1. 표준시약 및 실험장치

본 연구에 사용된 glycerides류(mono-, di-, triglyceride) 표준 시약은 glycerol mono stearate(GMS, SUPELCO제, 99%, Bellefonate, USA), glycerol distearate(GDS, SUPELCO제, 99%, Bellefonate, USA), glycerol tristearate(GTS, SUPELCO제, 99%, Bellefonate, USA)를 구입하여 정제 없이 바로 사용하였다.

Glyceride류 분리에 사용한 HPLC는 Hewlett Packard HP 1050 series quaternary pump로서 35900E interface 및 Alltech 500 ELSD가 부착되었고, ELSD의 tube 온도는 90°C, nebulizing gas(N₂, 99.99%) 흐름속도는 2.60 L/min 일때 바탕선이 안정되었고, 실험에 적용하였다.

이동상으로 사용한 n-헥산, 이소프로판올, 에틸아세테이트는 B&J사 HPLC급을 Millipore membrane filter(type FH. pore size=0.5 μm)로 여과하여 사용하였다.

2.2. 표준용액 및 시료용액 조제

표준용액은 3종 glyceride 표준품(GTS, GDS, GMS)을 n-헥산과 이소프로판올을 동일한 부피비로 섞은 혼합액에 용해시켜서 1000 mg/L 농도로 조제하고 이 용액을 상기 혼합액으로 각각 희석하여 사용하였다. 시료는 국내 유통 중인 상업용 triglyceride 2종을 시중에서 구입하여 각각 20 mL 용량 플라스크에 0.3 g을 평량하고 상기 혼합액으로 녹인 후 표정하여 HPLC에 주입하였다.

2.3. HPLC 분석 조건

Glyceride류를 분리하기 위한 분석 조건은 분리관으로 Zorbax silica (250×4.6 mm, 5 μm)를 30°C로 유지하였고, 검출기는 ELSD를 사용하였다. 그리고 mono-, di- 및 tri-glycerides 류의 분석은 순상 LC 조건이 유리하여, 순상 용리액으로 흔히 사용하고 있는 n-헥산과 n-헥산, 이소프로판올, 에틸아세테이트 용리액 시스템을 선택하여 분리 분석을 시도하였다. n-헥산, 이소프로판올, 에틸아세테이트 혼합액 (B)의 비율을 조절하고, 한편으로 헥산 (A) 용리액과의 혼합 비율을 적절히 조절하여, 분리성분이 적당한 용량인자 (Capacity factor)를 가지도록 하여, 분석에 필요한 이동상 조건을 확립하였다. 이동상은 n-헥산(Eluent A)과 n-헥산: 이소 프로판올: 에틸아세테이트: 3차 정제수: 트리플루오로아세트산(850:150:50:10:1 V/V)의 혼합액(Eluent B)으로 이동상의 조성과 기울기 용리 조건을 Table 1에 나타내었다. 이때 흐름속도는 1.0 mL/min이며, 주입량은 20 μL 였다.

3. 결과 및 고찰

HPLC를 이용한 3종의 glycerides 분석은 이동상으

Table 1. Step gradient program for separation of GTS, GDS and GMS

Time(min)	Eluent A*	Eluent B**
0	100	0
4	100	0
15	0	100
20	0	100
21	100	0
26	100	0

*Eluent A: n-hexane.

**EluentB: n-hexane:isopropanol:ethylacetate:water:trifluoroacetic acid (850:150:50:10:1 V/V).

로 n-헥산과 이소프로판올의 기울기 용리하에서 순상(silica) 분리관으로 Fig. 1에 나타낸 바와 같이, 분자 중 극성 부분에 의한 차이를 이용하여 GTS, GDS, GMS의 용리 순서로 우수한 분리를 얻을 수 있었다. 그런데, ELSD를 이용하여 분석할 경우 ELSD의 신호 세기는 다른 종류의 HPLC 검출기와 비교할 때 특이한 점이 있다. 사용시 분리관에서 용출되는 분석 물질의 양과 신호 세기의 관계는 식(1)과 같다.¹⁹

$$A = KM^E \quad (1)$$

두 값에 자연대수를 취하면 식(2)와 같이 된다.

$$\ln A = E \ln M + \ln K \quad (2)$$

이 때 A는 봉우리의 면적, M은 분리관에서 용리되는 분석물의 무게, E는 기울기 항이며, $\ln K$ 값은 절편, 여기에서 E, K 값은 주어진 분석 시스템에서 고유한 값을 가진다. 따라서 주입량과 신호 면적을 모두 log 값으로 취하여 검정 곡선 작성에 적용한다. 이 관계는 Stolyhwo가 보고한 바 있다.²⁰⁻²¹ 그리고 3종의 glycerides류 분석에 따른 검정 곡선을 Fig. 2에 나타내었다. 또한 각 성분의 용리 시간과 검출 한계, 검정 곡선 작성에 적용된 농도 범위 및 Fig. 2의 검정 곡선으로부터 구한 log-log 기울기를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서와 같이 log-log기울기는 1.06~1.32의 값을 보여주었고, 각 성분의 검출 한계는 0.3-2 ppm 수준으로 분석되었으며, 4-1000 ppm 농도 범위에서 검량선을 도식한 결과 각 성분의 검량 직선성은 0.994~0.998로 나타나 좋은 직선성을 보여 주었다. 이는 실제 시료 분석에 적용할 경우 비교적 훌륭한 감응도를 가질 수 있는 것으로 나타났다.

한편, 시중에 유통 중인 상업용 triglycerides 2종을 구입하여 상기 분석법으로 triglycerides가 함유하고 있

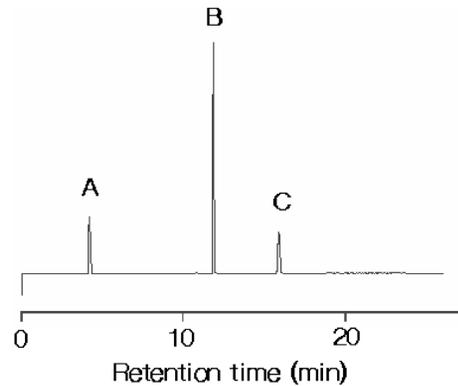


Fig. 1. A chromatographic separation of glycerol stearates (A: glycerol tristearate, B: glycerol distearate, C: glycerol monostearate).

Table 3. Analysis of commercial triglycerides

Sample	GDS*	GMS
Commercial triglyceride A	2.1±0.1%	N.D
Commercial triglyceride B	1.8±0.1%	N.D

*Mean values were determined with four measurements (<5% RSD).

는 GDS와 GMS 함량 분석에 실제 적용하였으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 3의 크로마토그램에서 보듯이 바탕선이 안정되고 GDS 성분의 방해없이 완전히 분리된 모습을 보여 주고 있다. Fig. 3의 봉우리 a 앞에 용리된 성분의 봉우리는 시료에 함유된 것으로 추정되는 미지 물질의 봉우리로 생각된다. 그 분석 결과를 Table 3에 나타내었는데, 상업용 triglycerides에는 약 2% 수준의 GDS 함량을 보여주고 있다. 한편, 시료 중 GMS는 불검출로 나타났다. 정량 분석을 위한 관점에서 4회 HPLC 주입 시 ELSD의 띠 면적 재현성은 상대표준편차 5% 미만으로 나타났고, 이는 ELSD 검출기가 glycerides

Table 2. Retention times, detection limits, calibration ranges, log-log slopes, intercepts, numbers of data and linear correlation coefficient

Standard type	Retention time (min)*	Detection limit (ppm)**	Calibration ranges (ppm)	Log-log slope***	Intercept***	Number of data(n)	Linear correlation coefficient(R ²)
GTS	4.19±0.04	1	4-125	1.25(±0.02)	1.73(±0.04)	6	0.994
GDS	11.80±0.05	0.3	4-1,000	1.06(±0.01)	2.44(±0.02)	11	0.998
GMS	15.88±0.05	2	4-1,000	1.32(±0.01)	1.56(±0.04)	11	0.996

*Retention times are the mean values as determined with four experiments for each standard.

**Detection limits were determined based on experimentally detectable signals of 3 S/N level.

***Numbers in parentheses are standard deviations.

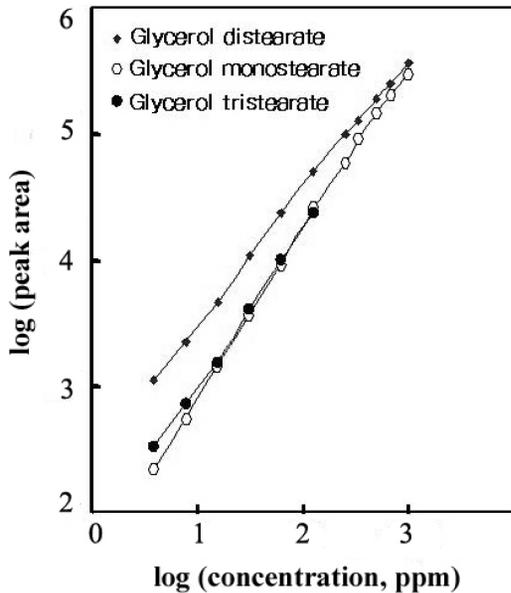


Fig. 2. Calibration curves for glycerol mono-, di-, tristearate. Plot of $\log(\text{peak area})$ vs $\log(\text{concentration, ppm})$: each point is the mean of four injections: injection amount: 20 μL .

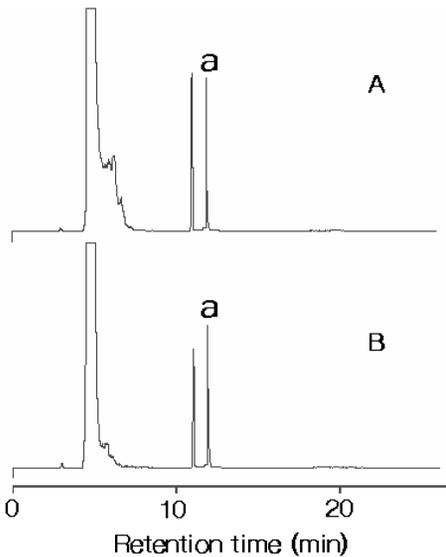


Fig. 3. Chromatograms of commercial triglycerides (a: glycerol distearate). A: triglyceride commercial product 1, B: triglyceride commercial product 2

검출 및 분석에 훌륭히 적용됨을 보여 주고 있다. 따라서 상기 분석방법은 시료 전처리가 필요 없으며, 간편하게, 20분 이내에 시료를 분석할 수 있는 경제적인 분석법이라 생각된다.

4. 결 론

Neutral lipid로써 glycerol mono-, di- 및 tristearate 성분 분리분석에 분리관으로 순상 silica(250×4.6 mm), 이동상은 n-헥산과 n-헥산, 프로판올, 에틸아세테이트 혼합 용매를 사용하고, ELSD 검출 시스템을 이용하는 분석법을 확립하였다. 그 결과 ELSD 검출기는 glyceride류 분석에 훌륭하게 적용 가능하며, 그 검출 한계는 0.3~2 mg/L의 값으로 조사되었다. 확립된 분석법은 다루기 쉽고, 간편하여, 상업용 triglycerides 분석에 쉽게 적용 가능함을 알 수 있었다.

참고문헌

1. E. Jugermann, "Bailey's Industrial Oil and Fat Products", Vol. 1, 675, D. Swern, Ed. John Wiley and Sons, New York, U.S.A., 1996.
2. E. F Neckermann and P. P. Noznick, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **45**, 845 (1968).
3. H. Halvarson and O. Qvist, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **51**, 162 (1974).
4. E. M. Goh and R. E. Timms, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**, 730 (1985).
5. T. Lee, C. Hastilow and K. Smith. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**, 785 (1988).
6. J. Blu and W. R. Doehler, *Lipids*, **5**, 601 (1970).
7. A. Johansson, L.A. Appelqvist, *Lipids*, **13**, 658 (1978).
8. K. Rissler, *J. Chromatogr. A.*, **667**, 167 (1994).
9. Yang Wei and Ming-Yu Ding, *J. Chromatogr. A.*, **904**, 113 (2000).
10. Wenkui Li and John F. Fitzloff, *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **25**, 257 (2001).
11. Quan Zhou, Lin Zhang, Xue-Qi Fu and Guo-Qiang Chen, *J. Chromatogr. B*, **780** 161 (2002).
12. Cecilia Orellana-Coca, Dietlind Adlercreutz, Maria M. Andersson, Bo Mattiasson and Rajni Hatti-Kaul, *Chemistry and Physics of Lipids*, **135** 189 (2005).
13. A. Bruns, *Fat. Sci. Technol.*, **90**, 289 (1988).
14. M. Dreux and M. Lafosse, *Spectra 2000*, **24**, 153 (1990).
15. M.T.G Hierro, M.C. Tomas, F. Fernandez-Martin and G. Santa-Maria, *J. Chromatogr.*, **607**, 329 (1992).
16. W.S. Letter, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 225 (1993).
17. J. Liu, T. Lee, E. Bobik, Jr., M. Guzman-Harty and C.

- Hastilow, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 343 (1993).
18. B. Marcato, G. Cecchin, *J. Chromatogr.* **730**, 83 (1996).
19. H. Bunger and U. Pison, *J. Chromatogr. B.*, **672**, 25 (1995).
20. A. Stolyhwo, H. Colin and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, **265**, 1 (1983).
21. A. Stolyhwo, H. Colin, M. Martin and G. Guiochon, *J. Chromatogr. A.*, **288**, 253 (1984).