

LC/MS와 ^1H NMR을 이용한 화장품속의 글리세린 비교분석

박교범 · 박찬조 · 이석근★

한국화학연구원 화학분석센터
(2007. 6. 12. 접수, 2007. 10. 8. 승인)

Comparative analysis of glycerin in cosmetics by LC/MS and ^1H NMR

Gyo-Beom Park, Chan Jo Park and Sueg-Geun Lee★

Center for Chemical Analysis, Korea Research Institute of Chemical Technology
P.O. Box 107, Yusung, Taejeon 305-343, Korea
(Received June 12, 2007; Accepted October 8, 2007)

요 약: 액체크로마토그래피/질량분석법(LC/MS) 및 핵자기공명분광분석법 ^1H (NMR)을 이용하여 화장품에 들어있는 글리세린을 동시 비교분석하였다. 화장품 시료를 물에 용해시키고 수산화나트륨을 첨가하여 시료용액을 강알칼리 상태로 유지시킨 후, 시료용액 중의 글리세린을 benzoyl chloride로 유도체화 반응 시키고 유도체화된 글리세린을 pentane으로 추출하여 LC/MS로 정량분석 하였다. ^1H NMR 분석은 시료를 전혀리 없이 D_2O 용매에 직접 용해시키고, 글리세린을 ERETIC(Electronic REference To access *In vivo* Concentrations) 방법을 이용하여 ^1H NMR로 직접 정량분석 하였다. LC/MS 및 NMR 분석결과 LC/MS의 검량선은 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도범위에서 $r^2 = 0.9991$ 이었고 ^1H NMR의 검량선은 25-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도범위에서 $r^2 = 1$ 의 상관계수를 갖는 좋은 직선성을 얻었다.

Abstract: The comparative analysis of glycerin in cosmetic samples was carried out by LC/MS and ^1H NMR spectrometry. For the LC/MS analysis, aqueous solution was controlled in strong basic condition with sodium hydroxide, and benzoyl chloride was added to the solution for the derivatization of glycerin. The derivative was extracted using pentane and analyzed by the LC/MS. For the ^1H NMR analysis, sample was directly dissolved in D_2O solvent without pretreatment. The quantitative analysis of glycerin was done by ^1H NMR ERETIC method. The analysis results of LC/MS and ^1H NMR showed that the calibration curves were a good linearity with $r^2 = 0.9991$ in the range of 0.1 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and $r^2 = 1$ in the range of 25 to 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively.

Key words: Glycerin, LC/MS, ^1H NMR, ERETIC

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-860-7710 Fax : 82-(0)42-860-7794

E-mail : leesg@pado.kRICT.re.kr

1. 서 론

글리세린은 그 고유의 특성과 안정성 때문에 화장품, 의약품 및 식품첨가물 등의 분야에 광범위하게 사용되고 있다.¹ 우리가 항상 사용하고 있는 화장품은 지방, 오일 및 계면활성제등의 각종 첨가제들이 복합적으로 많이 들어 있으며, 이 중 글리세린 분석을 하기 위하여 액체크로마토그래피/질량분석법의 전자분무이온화법(LC/ESI-MS)과 ¹H NMR을 이용한 비교분석법을 연구하였다.

글리세린은 휘발성이 낮고 극성이 커 가스크로마토그래피(GC) 및 가스크로마토그래피/질량분석기(GC/MS)에 직접 주입할 때 주입구나 칼럼 등에 흡착되어 감도가 매우 낮은 단점이 있기 때문에 대부분 silylation 유도체화에 의한 GC나 GC/MS 분석,² 또는 형광^{3,4}이나 분광광도계^{5,6}를 이용하는 방법 또는 동위원소 질량분석기⁷ 등을 이용하는 방법이 있으며, 일반적으로 사용되고 있는 방법은 silylation 유도체화에 의한 GC나 GC/MS로 분석하는 방법이다. 그러나 이 방법은 수분을 완전히 제거한 후 유도체화를 해야 하므로 수용액상태의 글리세린을 먼저 유기용매로 추출하여 농축한 후 유도체화 하는 과정에서 실험의 오차가 크게 나타날 수 있으며, 복잡하고 다양한 매질에서 간섭을 받을 뿐만 아니라 많은 시간과 노동력이 소비되는 단점을 가지고 있다.

본 연구에서는 이러한 점을 개선한 새로운 유도체화 방법으로써 수용액 상태에서 직접 유도체화를 하기 위하여 물에 시료를 녹인 후 수산화나트륨용액을 가하여 강알칼리성으로 조절 후 benzoyl chloride를 사용하여 물에서 직접 유도체화 하고 유도체화물을 pentane으로 추출하여 LC/ESI-MS의 SIM(selected ion monitoring)방법⁸으로 분석하였다. 이 방법은 silylation 유도체화 보다는 간편한 방법이지만 silylation 및 benzoyl chloride를 이용한 유도체화 방법 모두 전처리를 해야 하는 번거로움이 있다.

따라서 전처리 및 유도체화 없이 화장품에서 글리세린을 직접 분석하기 위하여 ¹H NMR을 이용한 분석법을 연구하였다. 이 분석법은 ¹H NMR에서 사용되는 ERETIC(Electronic REference To access *In vivo* Concentrations) 방법^{9,10}을 이용하여 화장품을 D₂O 용매에 직접 녹인 후 글리세린의 특성피크를 ¹H NMR로 직접 정량분석 하였다.

LC/MS 및 ¹H NMR을 이용한 글리세린의 함량을 비교한 결과 서로 유사한 값을 얻었으며, electronic

peak를 기준물질의 농도로 사용하는 ¹H NMR을 이용한 방법이 시료 전처리 등 여러 가지 면에서 크로마토그래피 방법보다 더 간편한 방법임을 제시하여 새로운 분석방법으로 사용될 수 있음을 보여주었다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 표준물질로 사용된 글리세린(99%)과 유도체화 시약인 benzoyl chloride(99.8%)는 Sigma-Aldrich(Milwaukee, WI, USA), 수산화나트륨은 Merck(Darmstadt, Germany)로 부터 각각 구입하여 사용하였으며, 유도체를 추출하기 위해 사용한 pentane은 Berdick & Jackson(Muskegon, MI, USA)에서 구입하였다. 표준 용액을 만들기 위하여 사용된 D₂O(99.8%)용매는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.(Andover, MA, USA)에서 구입하였고, 물은 Milli-Q(Millipore, Bedford, USA) 탈이온 장치를 통과시킨 증류수를 사용 하였다.

2.2. LC/ESI-MS 기기 및 조건

본 연구에서 사용한 LC/MS는 HP-1100 Series liquid chromatograph/HP 1100 Series mass selective detector(Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 구성된 것을 사용하였으며, MS의 이온화 방식은 전자분무이온화(electrospray ionization, ESI)법 이었고, 이온의 분리 방식은 사중극자 질량 분리관이 부착된 LC/MSD를 이용한 역상 액체크로마토그래피에 의하여 분석하였다. 액체크로마토그래피의 분석조건으로는 Luna-C₁₈(150 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) 칼럼을 사용하였으며, 이동상으로서 methanol:10 mM ammonium acetate buffer = 90:10(V/V%) 조성의 등용매 용리로, 유속은 0.4 mL/min 이었다.

전자분무이온화법의 분석조건은 유속 10 L/min의 질소(99.99%)를 drying gas로 사용하였으며, 온도는 350°C이였으며, 이때 분사압력은 30 psi로 시료를 분무시키고 글리세린의 fragment voltage는 80 V를 적용 하였다.

Capillary voltage는 3,500 V 이였으며, 특정이온을 선택하여 검출하는 selected ion monitoring(SIM)법을 사용하였다. 그리고 시료 주입방법은 autosampler를 이용하여 10 μL를 주입하여 분석하였다.

LC/ESI-MS에 사용된 글리세린 유도체 표준물질의 머무름 시간 및 특성이온은 Table 1에 나타냈다.

Table 1. Retention time and characteristic ions of glycerin derivative

Compounds	Retention time (min)	Characteristic ions (m/z)	
		Quantitation ion	Confirmation ion
Glycerin derivative	6.61	283.4	427.5

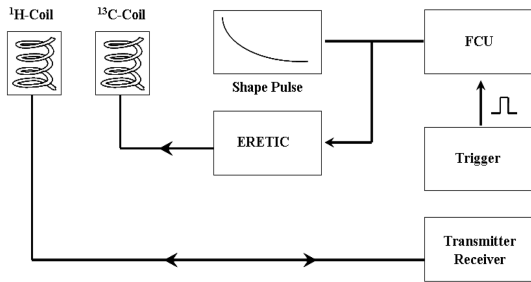


Fig. 1. Block Diagram for the ERETIC method.

2.3. ^1H NMR 기기 및 조건

본 연구에서는 5 mm broad band probe가 장착된 Bruker AVANCE-700 MHz NMR spectrometer를 사용하였으며, ERETIC 실험방법의 block diagram은 Fig. 1에 보여주었다. 이 방법은 block diagram에서 볼 수 있듯이 ^1H 코일을 이용하여 ^1H 의 pulse를 준 후 시료의 ^1H 시그널을 측정하는 동안 ^{13}C 코일을 이용하여 ^1H 의 Frequency Control Unit (FCU)에서 생성된 주파수를 router를 통해 얻어진 ^1H 의 주파수와 exponential 함수를 가진 shape pulse를 보냄으로써 ^1H 코일이 시료의 시그널과 같이 electronic 시그널을 얻을 수 있게 되는 것이다. Exponential 함수는 Fourier transform 후 Lorentzian line shape을 가지므로 얻어진 electronic 시그널은 시료의 ^1H NMR의 단일 피크와 같은 모습을 가지게 되며, 화학적 이동은 decoupler를 사용하는 것 같이 원하는 위치에 놓이게 할 수 있고, 피크의 크기는 shape pulse의 power에 따라서 조정할 수 있다. 즉 기기의 여러 조건을 고정시킨 후 알려진 농도의 시료와 함께 얻어진 ERETIC 피크는 기기의 조건을 변화시키지 않으면 항상 같은 크기의 피크를 주게 되며 이 피크의 면적을 정량분석에 사용할 수 있게 되는 것이다.

정량분석을 위해서 사용된 ERETIC 피크(2.5 ppm)는 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 글리세린을 기준으로 만들어졌으며 얻어진 모든 스펙트럼은 Bruker의 pulse program인 eretic 30을 사용하였다. Relaxation delay 3초와 acquisition

time 2.6 초인 총 5.6 초의 repetition time은 30° pulse에서 글리세린의 saturation free 스펙트럼을 얻기에 충분하였다. 각각의 스펙트럼은 700.3 MHz에서 32 K data points와 128 scan으로 얻어졌으며 소요시간은 약 12 분이였다.

2.4. 표준용액의 제조

LC/ESI-MS에 사용한 글리세린의 표준용액 제조는 구입한 표준품을 0.1 mg까지 무게를 달아 증류수를 사용하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준용액으로 만들고, 검정용액은 0.1, 0.25, 0.5, 1, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위로 표준용액을 희석하여 만들었다.

또한 ^1H NMR에 사용한 글리세린의 표준용액 제조는 표준품을 0.1 mg까지 무게를 달아 D_2O 를 용매로 사용하여 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 표준용액으로 만들어 25, 50, 100, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위로 표준용액을 희석하여 검정용액은 만들어 사용하였다. 제조한 모든 표준용액들은 냉장고에 보관하여 사용하였다.

2.5. 시료

화장품 시료는 11종의 시료를 국내에서 구입하여 사용하였으며, LC/ESI-MS에 사용된 화장품 시료는 0.1 g을 10 mL 증류수에 용해시킨 후 유도체화에 사용하였고, ^1H NMR 분석에 사용한 화장품 시료는 0.02 g을 2 mL D_2O 용매에 전처리 없이 직접 용해시킨 후 0.7 mL를 취하여 5 mm NMR 튜브에 넣어 분석하였다.

2.6. 유도체화 방법

LC/ESI-MS를 분석하기 위해서는 유도체화가 필요하며 유도체화는 다음과 같이 하였다. 먼저 검정곡선을 작성하기 위한 0.1-10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위로 조제한 글리세린 표준용액의 시료와 위에서 만든 화장품 시료용액을 1 mL씩 취하여 5 mL 바이알에 각각 넣고, 여기에 30% 수산화나트륨 용액을 700 μL 씩 넣어 강알칼리성 조건으로 만든 다음 benzoyl chloride를 100 μL 첨가하고 초음파 진동기는 Fisher Scientific (Hampton, NH, USA) 제품을 사용하여 10분간 유도체화 반응을 진행시켰다.

유도체화가 종료된 후 실온에서 10분간 정치한 다음 pentane을 각각 2 mL씩 넣고 초음파 진동기로 10분 동안 유도체를 추출하였다. 추출물 중에서 1 mL만 취하여 pentane 용매를 질소로 휘발시키고 여기에 50% methanol 수용액 1 mL를 첨가하여 메이크업한 후 LC/ESI-MS에 10 μL 를 주입하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 검정곡선

0.1-10 µg/mL의 농도 별로 만든 글리세린 표준물질을 분취하여 유도체화 시킨후 LC/ESI-MS로 분석하여 얻어진 상관 관계식은 $y = 1858700x + 164913$ 이었고, 이때 r^2 값은 0.9991 이상이었다. ¹H NMR 분석에서는 25-500 µg/mL의 농도 별로 만든 글리세린의 표준물질을 Fig. 2에서와 같이 ERETIC 피크(2.5 ppm)를 기준으로 3.65 ppm에 나타나는 CH의 ¹H 피크의 적분한 값들을 비교하였으며 얻어진 검정곡선의 r^2 값은 1을 나타냈으며 분석방법이 적합함을 알 수 있었다.

3.2. LC/ESI-MS 분석

화장품에 들어있는 글리세린을 검출하기 위하여 LC/MS의 감도와 선택성을 높이고자 유도체화가 필요

하며 유도체화의 전처리 시간을 단축하기 위하여 수용액상에서 benzoyl chloride로 직접 유도체화를 하였다.

알려진 바와 같이 silylation 유도체화를 하기 위해서는 수분이 없어야 하며 분석물질이 물에 존재하면 일반적으로 유기용매를 사용하여 물에서 추출 후 농축하여 분석물질에 존재하는 수분을 제거 한 후 유도체화를 해야 한다.

그러나 본 연구에서는 이러한 번거로운 과정을 생략하고 쉽고 간편하게 유도체화를 하기 위하여 물에 들어 있는 글리세린을 benzoyl chloride를 사용하여 직접 유도체화 하여 분석하였다.

Benzoyl chloride을 사용하여 글리세린을 유도체화하고 얻은 이온크로마토그램 및 질량스펙트럼을 Fig. 3과 Fig. 4에 각각 나타내었다.

Fig. 3은 유도체화 된 글리세린에 대한 이온크로마토그램으로서 LC/ESI-MS의 positive scan mode를 사

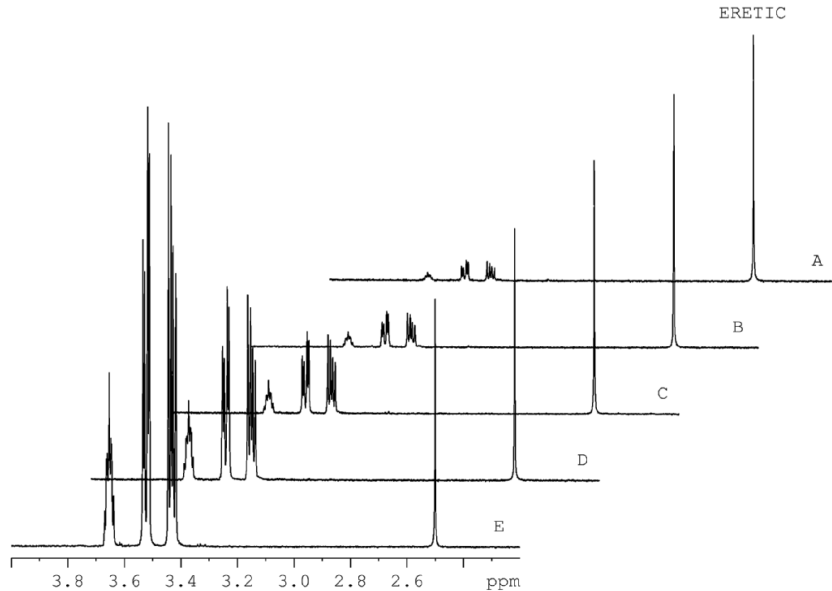


Fig. 2. A stack plot of proton NMR spectra at various concentration of glycerin in D₂O with ERETIC peak at 2.5 ppm. The glycerin concentrations of A - E are 25, 50, 100, 250, 500 µg/mL, respectively.

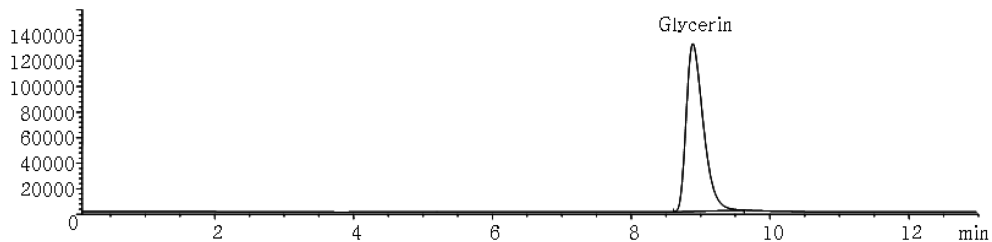


Fig. 3. Total ion chromatogram (TIC) of the derivatives of standard obtained by LC/ESI-MS.

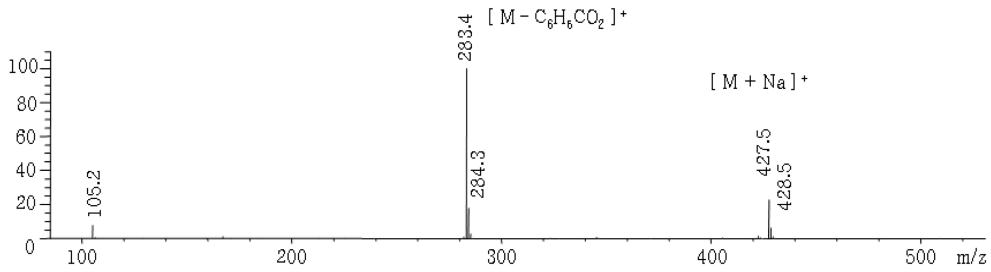


Fig. 4. Mass Spectrum for the derivatives of glycerin using LC/ESI-MS.

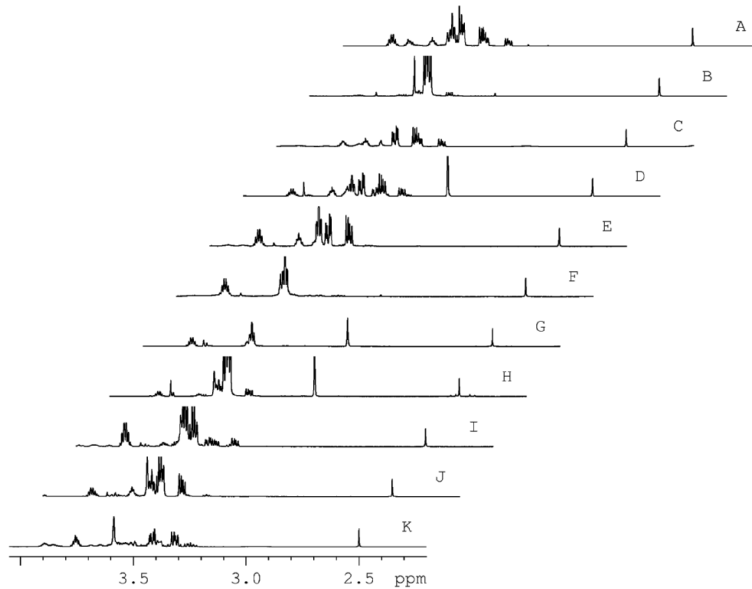


Fig. 5. Proton NMR spectra of various samples in D_2O with ERETIC peak adjusted with $200 \mu\text{g/mL}$ glycerin.

용하여 m/z 100-550의 질량 범위에서 분석하여 얻어진 결과이다. 이온크로마토그램에서 보는 바와 같이 표준물질은 본 실험의 분리 컬럼에 적용한 조건에 의하여 모두 15분 이내에 완전히 분리되어 나왔으며, 봉우리 모양이 모두 비극성 물질에서 볼 수 있는 것과 같이 뾰족한 대칭 형태를 나타내었다.

Fig. 4는 표준물질의 유도체에 대한 질량스펙트럼을 나타낸 것으로서, 유도체화 되기 전의 표준물질에 수소 대신 3개의 benzoyl 기 $C_6H_5CO^+$ (105 Da)가 결합하여 315 Da 만큼 질량이 증가하여 $[M + Na]^+ = 427$ Da의 adduct 이온이 생성된 것을 볼 수 있었으며 그 앞에 검출된 $[M - C_6H_6CO_2 + H]^+ = 283$ Da의 이온을 확인할 수 있었다.

이 결과는 LC/MS의 전자분무 이온화방법의 전형적인 스펙트럼으로 $[M + Na]^+$ 의 금속이온이 결합된 adduct 분자이온 뿐만 아니라 $[M - C_6H_6CO_2 + H]^+$ 와

같은 이온이 함께 측정됨으로써 유도체화 반응이 잘 진행되었음을 확인할 수 있었다.

3.3. 1H NMR 분석

모든 기기의 정량분석에서와 같이 1H NMR에서도 정량분석을 위해서는 기준이 되는 물질이 반드시 필요하다. 즉 내부에 정량의 표준물질을 첨가하거나 외부에 정량물질을 사용하여 검정곡선을 작성하게 된다. 그러나 이들은 각각 그들 고유의 단점을 가지고 있다. 최근 이러한 단점들을 극복할 수 있는 1H NMR 방법이 electronic reference 방법일 수 있다고 발표된 바 있다⁹. 우리는 실제 시료인 화장품에 들어있는 글리세린을 분석하기 위해서 $200 \mu\text{g/mL}$ 의 글리세린으로 만들어진 ERETIC 피크(2.5 ppm)를 기준으로 고정시킨 후 측정된 시료의 분석결과를 Fig. 5에 보여주었다. A, D, E, H, I, J 그리고 K 시료는 3.65 ppm에 뚜렷하게 나타나

Table 2. Concentration (%) of glycerin in cosmetics

Cosmetics samples	LC/ESI-MS (n = 5)	¹ H NMR (ppm)
A	3.77 ± 0.10	3.68
B	0.52 ± 0.02	0.48
C	3.69 ± 0.10	3.64
D	4.17 ± 0.17	4.03
E	4.42 ± 0.29	4.51
F	N.D.	N.D.
G	N.D.	N.D.
H	1.12 ± 0.07	1.07
I	0.74 ± 0.07	0.75
J	3.36 ± 0.17	3.42
K	0.20 ± 0.01	0.22

는 CH의 ¹H 피크의 적분한 값들을 비교하여 분석하였으며, B와 C 시료는 3.65 ppm에 나타나는 CH의 ¹H 피크와 3.51 ppm에 나타나는 CH₂의 ¹H 피크가 다른 화합물과 겹침으로 3.44 ppm의 CH₂의 ¹H 피크들을 적분한 값들을 비교하여 분석하였으며, F와 G 시료는 3.65 ppm에 나타나는 CH의 ¹H 피크, 3.51 ppm에 나타나는 CH₂의 ¹H 피크 및 3.44 ppm에 나타나는 CH₂의 ¹H 피크들에서 글리세린의 ¹H 피크들이 나타나지 않아 글리세린이 존재하지 않음을 쉽게 알 수가 있었다.

3.4. 시료의 분석결과

실제 시료인 11종의 화장품을 LC/ESI-MS와 ¹H NMR로 분석한 결과는 Table 2에 나타내었다. LC/ESI-MS로 분석한 결과와 ¹H NMR로 분석한 결과의 글리세린의 농도가 유사함을 알 수 있었으며, F와 G시료는 검출 되지 않았지만 적게는 0.2-0.74 % 까지 들어 있었으며 많은 것은 4.42 % 까지 들어있음을 확인할 수 있었다.

또한 ¹H NMR을 이용하면 전처리를 하지 않고도 LC/ESI-MS보다 훨씬 간편하게 분석할 수 있음을 보여 주었다.

4. 결 론

화장품에 존재하는 글리세린을 분석하기 위한 방법으로 지금까지는 유기용매에 녹여 직접분석하거나 유도체화 하여 GC 및 GC/MS로 분석하는 방법이 대부분이었으나 이러한 방법은 많은 시간이 소요되며 유도체화를 하지 않으면 감도가 낮아 분석이 어려운 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 수용액상의 시료에 benzoyl

chloride를 직접 사용하여 유도체화한 결과 반응시간이 10분 정도로, 기존의 유도체화 분석방법들 보다 간단하게, LC/ESI-MS를 이용 하여 분석하는 방법과 전처리가 전혀 필요 없는 새로운 분석방법인 ¹H NMR을 이용한 ERETIC 방법을 이용하여 비교 분석함으로써 ¹H NMR 방법은 앞으로 화장품뿐만 아니라 크로마토그래피를 이용한 복잡한 매질로 구성된 시료로부터 간편하고 분석시간을 획기적으로 줄일 수 있는 방법임을 보여주었다.

같은 시료를 LC/ESI-MS와 ¹H NMR을 이용하여 분석한 결과 LC/ESI-MS의 정량범위는 0.1-10 µg/mL 농도에서 r² = 0.9991의 상관관계 계수를 나타내었고, ¹H NMR의 정량범위는 25-500 µg/mL 농도에서 r² = 1.0에 가까운 값을 얻었다 (probe의 종류에 따라 또는 scan을 증가시키면 ppb 농도도 측정 가능함).

따라서 ¹H NMR을 이용한 글리세린의 분석은 유도체화 없이 시료를 D₂O 용매에 녹여 전처리 없이 직접 분석함으로써 LC/ESI-MS보다 간편하고 분석시간을 줄일 수 있었으며, 특히 화장품 등에서도 같이 글리세린의 함량이 % 단위로 많이 함유된 시료를 정량하기 위해서는 ¹H NMR을 이용한 방법이 기존의 방법들보다 표준방법이 될 수 있음을 보여주었다.

참고문헌

1. K. Kudo and R. Ito, *Toho Igakkai Zasshi*, **19**, 415-417 (1972).
2. J. Graca and H. Pereira, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 5476-5483 (2000).
3. I. L. Mattos, J. M. Fernandez-Romero, M. D. Luque de Castro and M. Valcarcel, *Analyst*, **120**, 179-182 (1995).
4. E. Mataix and M. D. Luque de Castro, *Talanta*, **51**, 489-496 (2000).
5. A. O. S. S. Rangel and I. V. Toth, *Anal. Chim. Acta*, **416**, 205-210 (2000).
6. M. A. Segundo and A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta*, **458**, 131-138 (2002).
7. G. Fronza, C. Fuganti, and P. Grasselli, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 477-480 (1998).
8. G. B. Park and S. G. Lee, *Anal. Sci. & Tech.*, **17**(6), 527-531 (2004).
9. S. Akoka, L. Barantin and M. Trierweiler, *Anal. Chem.*, **71**, 2554-2557 (1999).
10. V. Silvestre, S. Goupry, M. Trierweiler, R. Robins and S. Akoka, *Anal. Chem.*, **73**, 1862-1868 (2001).