

역상 HPLC에 의한 polysorbates의 산화에틸렌(EO) 분리 및 정량분석

이용화[†]

[†]호서대학교 융합기술연구소

(2012년 11월 19일 접수 ; 2012년 12월 14일 수정 ; 2012년 12월 16일 채택)

Determination and Ethylene Oxide(EO) Separation of Polysorbates by RP-HPLC

Yong-Hwa Lee[†]

[†]Hoseo University, Fusion technology,

165, Sechul-li, Beabang-eup, Asan-city, Chungnam, Korea

(Received November 19, 2012 ; Revised December 14, 2012 ; Accepted December 16, 2012)

요약 : 역상 HPLC에 의한 polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, polysorbate 80의 ethylene oxide(EO)분리 및 간편하고 빠른 정량분석 방법을 개발하였다. 분석조건으로 분리관은 YMC Pack Ph (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) 과 Phenomenex C4 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm)을 사용하였고, 검출기는 ELSD를 사용하였으며, 이동상은 water/acetonitrile의 기울기 용리에 의해 분석되었다. 이때 검량선의 상관계수(r^2)는 180.2~980.5 μg/mL농도 범위에서 0.997이상 이었고, 검출한계, 정밀성이 우수하였다. 이 방법은 polysorbates의 산화에틸렌 분리분석 및 간편하고 빠르게 정량분석 가능함을 보여 주었다

주제어 : polysorbate, EO분리, HPLC.

Abstract : The EO separation and quantitative determination of polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60 and polysorbate 80 was carried out by reversed phase HPLC. The water/acetonitrile was used for the mobile phase of gradient conditions. An YMC Pack Ph (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) and Phenomenex C4 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 μm) and the selected ELSD detector was applied. The analysis results of HPLC showed good linearity with correlation coefficient of $r^2=0.997$ in the rage of 180.2~980.5 μg/mL and detection limit.

Keywords : polysorbate, ethylene oxide separation, HPLC..

[†]주저자 (E-mail : yhleef@hoseo.edu)

1. 서론

계면활성제는 계면에 흡착하여 계면의 자유에너지를 낮추어 계면의 성질을 현저히 변화시키는 물질을 말하며, 화학적으로 한 분자 내에 친수성기와 친유성기를 동시에 갖는 양친매성물질이다. 즉 서로 다른 두 상 간에 형성된 계면에 흡착하여 계면 물성을 변화시키고 서로 섞이지 않는 물질을 유화 등의 형태로 혼합되게 하는 것이다. 계면활성제는 일반적으로 세척력, 유화력, 분산력, 침투력, 기포력 등을 지니고 있어 각기 그 특성에 따라 섬유, 제지, 사진, 도료, 화장품, 의약품, 농약, 금속, 토목·건축, 윤활유, 식품, 전자 산업 등 많은 산업분야에서 여러 용도로 널리 이용되고 있다[1-11]. 화장품에 사용되는 계면활성제는 에멀전과 같이 오일을 혼합하기 위한 유화제, 향 등과 기타 물에 불용인 물질을 용해하기 위한 가용화제, 안료를 분산시키기 위한 분산제 및 세정을 목적으로 하는 세정제가 대표적 응용분야이고 화장품에 사용하는 계면활성제는 일반 공업 분야와는 달리 인체에 직접 사용되는 것으로서 계면활성제의 다른 특성보다도 우선적으로 고려되어야 할 사항은 인체에 대한 안전성이다.

비이온 계면활성제는 이온성에 의한 친수기를 갖는 대신 수산기(OH)나 산화에틸렌기(EO)에 의한 물 분자와 수소결합에 의해 친수성을 갖는 계면활성제이다. 이온성 계면활성제보다 피부에 대한 안전성이 높으며 유화력이 우수하므로 세정제를 제외한 에멀전 제품에서 유화제로 사용되고 있다. polysorbates는 솔비탄(Sorbitan)과 지방산을 반응시키고 산화에틸렌 20몰을 부가시킨 유화제로서 높은 표면활성과 자극이 낮으므로 화장품, 생활용품, 의약품 등 여러 산업에 유화제, 분산제, 소포제로서 많이 사용된다. Polysorbates는 의약산업에서 용해제, 화장품에서 유화제로 사용하는데 이들 제형의 안정성은 계면활성제의 양에 많이 의존하므로 분석방법을 개발하는 것은 제품 제조에 중요한 일이다. Polysorbates의 정량분석방법은 colorimetry, thin layer chromatography, 그리고 HPLC에 의한 방법이 발표되었으나 불충분한 결과를 주었다[12-14].

화장품 유화제로 많이 쓰이는 비이온 계면활성제의 시료전처리, 크로마토그래피 분석, 검출 방법 등에 관하여 여러 문헌에서 발표되었다

[15-21]. 비이온 계면활성제의 친유기는 이온성 계면활성제와 거의 같지만 친수기인 산화에틸렌 부가 몰수에 따라 물에 대한 용해도가 다른 여러 종류의 계면활성제가 있다. 이런 친유기와 친수기의 밸런스(HLB)에 따라 제품에 사용하는 용도가 다르므로 산화에틸렌기 분석은 매우 중요하다. 가스크로마토그래피(GC)를 이용하여 올리고머를 분석할 경우 낮은 분자량을 분석하기는 문제가 없지만 큰 분자량은 휘발성이 낮기 때문에 유도체화가 필요하여 복잡하다[22]. 반면에 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 분자량이 큰 계면활성제 분석에 널리 사용되고 있다. 순상 HPLC는 계면활성제의 EO분포를 분리하고 [23-25], 탄소사슬분석은 C₈, C₁₈ 분리관을 사용하는 역상 HPLC를 주로 사용한다 [26-29]. 그리고 HPLC/UV검출기는 발색단이 없는 계면활성제에 적용하기 어렵고 RI 검출기는 선택성이 낮고 이동상의 기올기 용리를 할 수 없기 때문에 사용이 제한적이다 [30,31]. 그러나 증기화 광 산란검출기(ELSD)는 발색단이 없는 성분도 유도체화 없이 직접 분석할 수 있고 이동상의 기올기 용리가 가능하기 때문에 비이온 계면활성제의 분석에 많이 이용된다 [32-35].

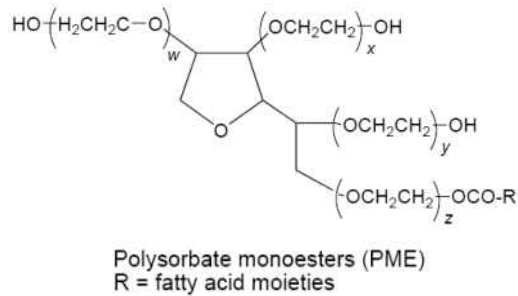
본 연구에서는 전처리 및 유도체화 없이 polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60 그리고 polysorbate 80를 직접 분석하기 위하여 HPLC/ELSD를 이용한 방법을 연구하였다. 이 분석방법은 polysorbates를 단일 피크로 만들어 간단하고 빠르게 정량분석할 수 있고, 부가된 산화에틸렌 분포를 분석할 수 있는 방법을 개발하고 질량분석기를 이용하여 산화에틸렌 부가몰수를 확인 하였으며, 또한 가스크로마토그래피를 이용하여 결합된 지방산의 탄소길이 분석법을 연구하였다. 이로서 화장품, 의약품, 식품 등 산업에 많이 사용되는 polysorbates를 간편하게 분석할 수 있는 방법을 개발 하고자 한다.

2. 실험

2.1. 시약

본 연구에서 표준물질로 사용된 polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, polysorbate 80은 Uniqema cooperation (U.K.) 에서 제조한

원료를 구입 후 사용하였고, 구조는 Fig. 1에 나타내었다. 이동상으로 사용한 acetonitrile, methanol 은 HPLC등급의 용매를 Burdick and Jackson Lab (USA)에서 구입 하여 사용 하였으며, water는 Milli-Q Water Purification System (USA)을 이용하여 전도도 $18.2 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$ 로 하여 제조하였다.



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

- polysorbate 20 : R=C11 (myristate)
 polysorbate 40 : R=C15 (palmitate)
 polysorbate 60 : R=C17 (stearate)
 polysorbate 80 : R=C17:1 (oleates).

Fig. 1. Structure of polysorbates.

2.2. HPLC 조건

본 연구에서 사용한 HPLC는 Agilent 1100 series(Agilent Technologies, palo Alto, CA, USA) 로 vacuum degasser, quaternary pump system, column oven, autosampler가 부착되어 있다. 산화에틸렌 분리를 위해 YMC Pack Ph(250 mm×4.6 mm i.d, 5 μm) 분리관을 사용하였고, 정량 분석하기 위해서 Phenomenex C4(250 mm×4.6 mm i.d, 5 μm) 분리관을 사용 하였다. HPLC 검출기는 Alltech3300 ELSD (Alltech Associates, USA)였으며, 이때 검출기는 55°C의 온도로 작동하고 질소 가스의 흐름 속도는 1.5 mL/min 조건이었다. 산화에틸렌분리를 위한 이동상조건은 Table 1, 정량분석을 위한 이동상조건은 Table 2에 나타내었다.

2.3. GC 및 LC-MS 조건

지방산에스테르의 탄소사슬분석에 사용한 가스 크로마토그래피는 HP6890 seriee (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, USA)로 FID 검출기

가 부착되어 있으며, 분리관은 HP-FFAP (25m×0.320mm, i.d, 0.25 μm)를 사용하였다. 주입구 온도는 245°C, 검출기온도는 250°C 였고, 분할주입(1:30) 방식으로 1 μl 주입하였다. 오븐 온도는 80°C에서 240°C까지 8°C의 속도로 온도를 상승시켰다. 본 실험에 사용된 MALDI 질량 분석기는 Axima CFR Time-of-flight mass spectrometer(Kratos, Manchester, UK)로 337 nm N₂ 레이저 광원이 장착되어 있다.

2.4. 표준용액 및 시료제조

표준 polysorbates를 methanol용매로 1000 $\mu\text{g/mL}$ stock solutions 을 만든 후 냉장 보관하였다. 검량선 작성을 위한 검액 제조 시에는 stock solutions을 methanol 로 희석하여 사용하였다. 표준 시료는 methanol을 이용하여 녹이고 여과막 (PTFE 0.45 μm)으로 통과 시켰다. 그 후 다른 조작 없이 분리관에 주입 하였다.

2.5. 분석방법 검토

분석법의 유효성을 평가하고, 실제시료에 응용 가능성을 validation 하기 위해 검량선의 직선성, 정밀성, 검출한계 등을 조사하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 크로마토그래피 분리

역상 HPLC를 이용하여 polysorbates 계면활성제의 산화에틸렌에 따른 분리를 Fig. 2 에 나타내었다. Polysorbates는 약 20 EO몰이 부가되어있고 산화에틸렌 몰수에 따라 분리되었다. 분석조건은 산화에틸렌에 따른 분리에 phenyl 분리관을 정지상으로 하고 이동상은 water/acetonitrile의 기울기 용리 조건으로 유도체화가 필요 없이 분리가 가능하였다.

Polysorbate 20의 EO부가몰수를 확인하기 위한 MALDI-TOF mass스펙트럼을 Fig. 3에 나타내었다. 얻어진 이온피크들은 44 units을 가지고 m/z 1000에서 1700 범위에서 m/z 1288을 정점으로 분자량이 관찰되었다. 이들 이온피크는 polysorbate+NH₄ 분자량이 반복되는 EO units분자량 차이를 가진다. 이로서 산화에틸렌 부가몰수를 확인할 수 있었다.

Table 1. Eluent Condition for EO Separation of Polysorbates

Time(min)	Flow rate (mL/min)	Water(%)	Acetonitrile (%)
0	1	85	15
5	1	85	15
60	1	50	50
75	1	40	60
80	1	40	60
85	1	85	15

Table 2. Eluent Condition for Quantitative Determination of Polysorbates

Time(min)	Flow rate (mL/min)	Water(%)	Methanol (%)
0	1	60	40
30	1	20	80
50	1	20	80
55	1	60	40

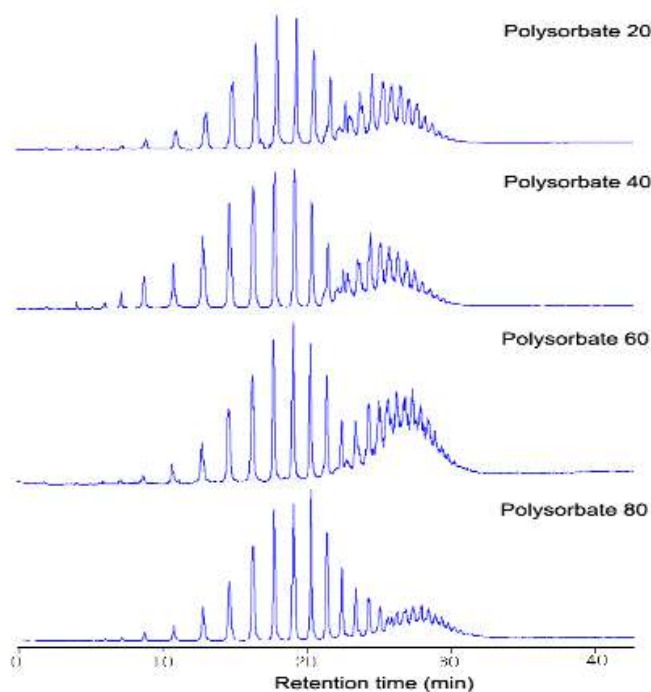


Fig. 2. HPLC chromatograms showing the EO separation of polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60 and polysorbate 80.

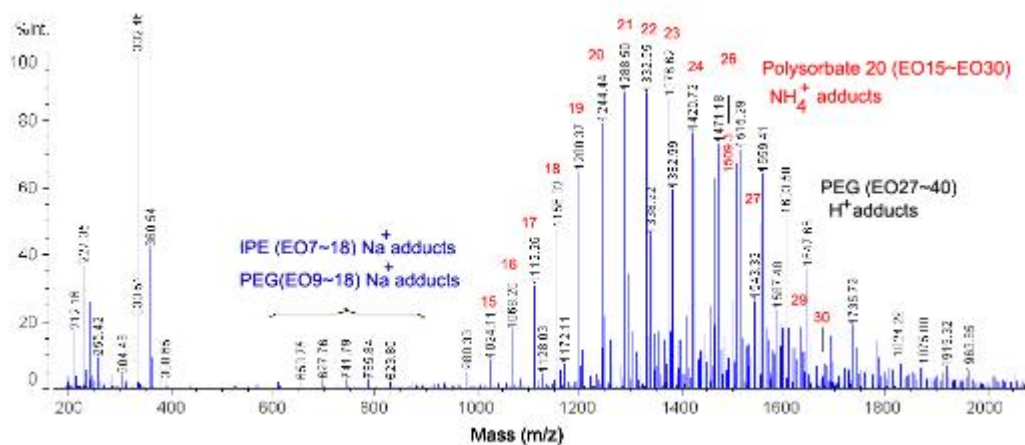


Fig. 3. MALDI-MS spectra of polysorbate-20 (polyethylene 20 sorbitan monolaurate 12:0).

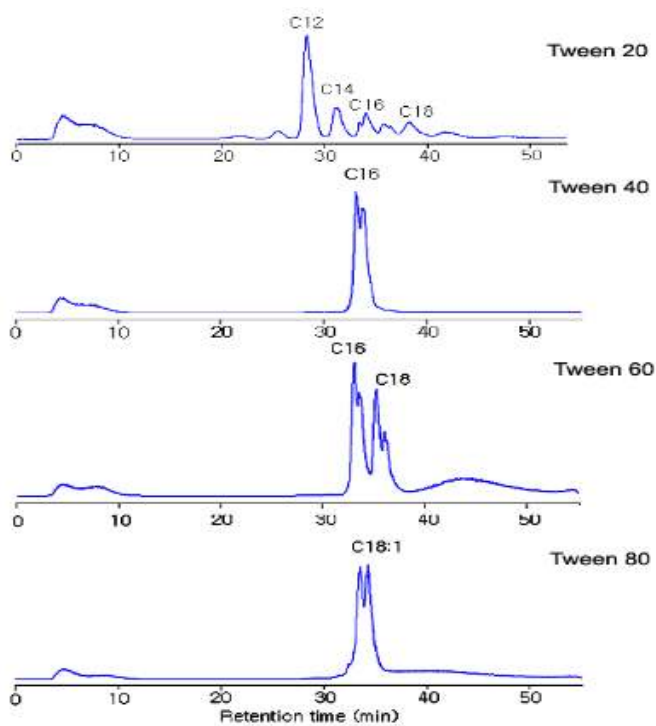


Fig. 4. Chromatogram of polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60 and polysorbate 80 for quantitative determination by HPLC.

3.2. Method Validation

Polysorbates를 정량분석하기 위하여 산화에 탈렌 분포에 따라 분리하지 않고 C₄ 분리관 (Phenomenex C₄:250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm)을 사용하고 water/acetonitrile 기울기 용리조건으로 단일 피크로 분석한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Polysorbates는 탄소동족체를 가지고 탄소 길이에 따라 여러 개의 피크를 확인할 수 있다. Polysorbate 20은 C₁₂~C₁₈의 알킬분포를 보이며 알킬기 크기순으로 분리되었고 검출한계는 50.2 μg/mL이었다. 나머지 Polysorbate 40, Polysorbate 60 및 Polysorbate 80도 알킬 분포에 따라 분리된 결과를 보였다.

분석법의 유효성을 평가하고, 실제시료에 응용 가능성을 validation 하기 위해 검량선의 직선농도범위, 검출한계, 상관계수(r^2), 정밀성을 조사한 결과는 Table 3에 나타내었다.

Polysorbate 20은 직선농도범위는 180.2~725.0 μg/mL에서 상관계수는 0.998였고, 이때 검출한계(S/N=3)는 50.2 μg/mL, area RSD는 0.9~3.6을 보였다. Polysorbate 40은 직선농도 185.4~763.1 μg/mL의 범위에서 실험했을 때 상관계수는 0.999였고, 이때 검출한계(S/N=3)는 55.5 μg/mL, area RSD는 0.6~3.7를 얻었다. Polysorbate 60은 직선농도 240.0~956.1 μg/mL의 범위에서 실험했을 때 상관계수는 0.997였고, 이때 검출한계(S/N=3)는 60.0 μg/mL, area RSD는 0.5~2.1를 얻었다. 그리고 polysorbate 80은 직선농도 230.0~980.5 μg/mL의 범위에서 실험했을 때 상관계수는 0.998였고, 이때 검출한계(S/N=3)는 60.0 μg/mL, area RSD는 0.8~4.5를 얻음으로서 유효성이 우수함을 알 수 있었다.

Table 3. Detection Limit, Working Range, Correlation Coefficient, Area RSD of Studied Surfactants

surfactant	Detection limit (μg/mL) ^a	Working range(μg/mL) ^b	Correlation coefficient ^c	Area RSD
polysorbate 20	50.2	180.2~725.0	0.998	0.9~3.6
polysorbate 40	55.5	185.4~763.1	0.999	0.6~3.7
polysorbate 60	60.0	240.0~956.1	0.997	0.5~2.1
polysorbate 80	60.0	230.0~980.5	0.998	0.8~4.5

^aDetection limits in this works were determined based on experimentally detectable signals of 3 S/N level and mass in the injected volume of 30 μL.

^bWorking ranges were determined with five to seven standard concentrations.

^cCorrelation coefficient were the linear ranges in the log-log plots

Table 4. Alkyl Distribution of Polysorbates by Methylation

	Alkyl distridution						
	C _{8:0}	C _{10:0}	C _{12:0}	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{18:1}
polysorbate 20	3.6%	4.7%	45.3%	21.2%	12.6%	8.9%	3.5%
polysorbate 40	0	0	0	0.9%	93.5%	5.4%	0.2%
polysorbate 60	0	0	0	0	53.3%	46.7%	0
polysorbate 80	0	0	0	0	0.1%	6.1%	81.8%

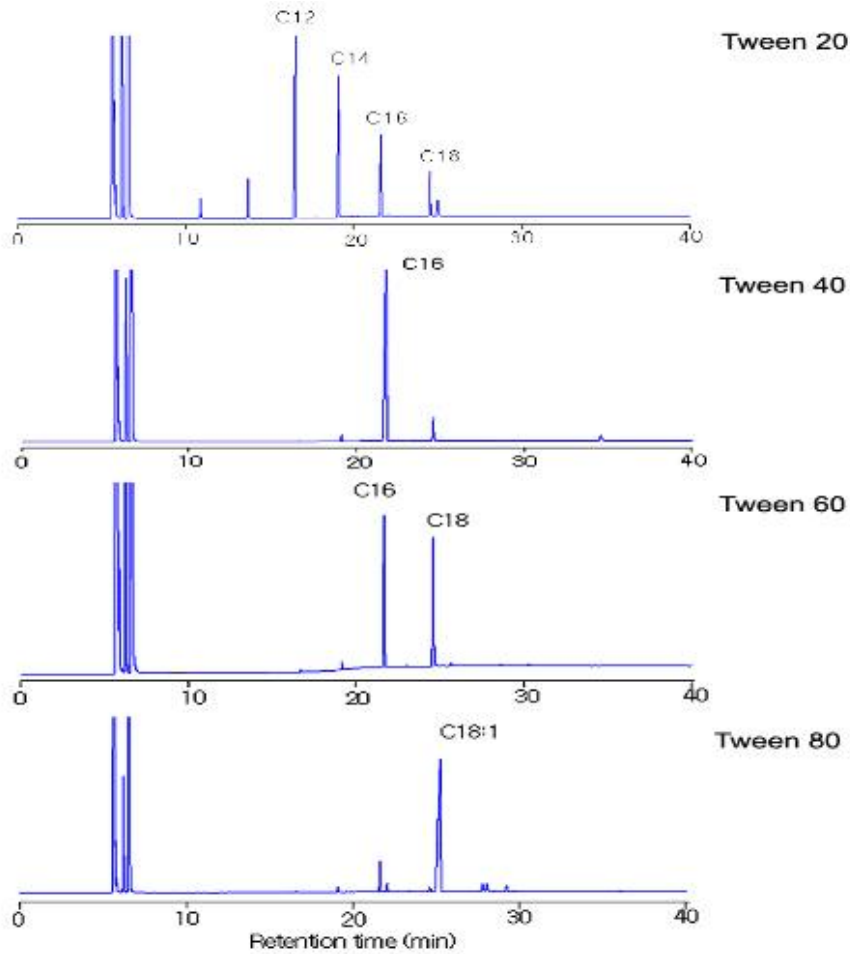


Fig. 5. GC chromatogram of polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60, and polysorbate 80 after methylation.

Polysorbates 계면활성제가 가지고 있는 탄소 시슬길이를 확인하기 위하여 methylation 시킨 후 GC분석을 하였다. 결과는 Fig. 5에 나타내었는데 C_{8:0}~C_{18:1}의 알킬 구조를 가지고 있었으며, 그들의 탄소 분포 비는 Table 4에 나타내었다. polysorbate 20은 C_{8:0}, C_{10:0}, C_{12:0}, C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} 탄소 분포를 가지고 있었고, polysorbate 40은 C_{14:0}, C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} 탄소 분포를 이루고 있었으며, polysorbate 60은 C_{16:0}, C_{18:0}, 그리고 polysorbate 80은 C_{16:0}, C_{18:0}, C_{18:1} 분포를 이루고 있었다.

4. 결론

역상 HPLC를 이용한 polysorbate 20, polysorbate 40, polysorbate 60 그리고 polysorbate 80 정량분석 및 산화에틸렌 분리분석법을 개발하였다. 산화에틸렌 분리를 위해 phenyl 분리관을 사용하고 정량분석을 위해 C₄ 분리관을 사용하였으며, 이동상으로 water/ acetonitrile을 사용하여 좋은 분리도를 가지고 완전하게 분리할 수 있었으며, 직선성은 상관계수(r^2)가 polysorbate 20은 0.998, polysorbate 40은 0.999, polysorbate 60은 0.997 그리고

polysorbate 80이 0.998였고 정밀성측정을 위한 area RSD는 polysorbate 20은 0.9~3.6, polysorbate 40은 0.6~3.7, polysorbate 60은 0.5~2.1 그리고 polysorbate 80이 0.8~4.5로 양호하였으며 검출한계는 polysorbate 20은 50.2 $\mu\text{g/mL}$, polysorbate 40은 55.5 $\mu\text{g/mL}$, polysorbate 60은 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 그리고 polysorbate 80이 60.0 $\mu\text{g/mL}$ 으로 우수한 정량 분석 방법을 개발하여 의약, 화장품 식품 등 산업적으로 유용성이 큰 polysorbates를 간편하고 빠르게 분석할 수 있어 연구개발 및 품질관리에 이용가능성이 높을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. W. G. Cutler and E. Kissa, Detergency : Theory and Technology, Surfactant Science Series, 20, 1, Marcel Dekker, New York (1987).
2. A. M. Schwartz, The Physical Chemistry of Detergency ed. E. Matijevic, Surface Colloid Sci., 195, Wiley, New York (1972).
3. C. A. Miller and P. Neogi, Interfacial Phenomena : Equilibrium and Dynamic Effects, Surfactant Science Series, **17**, **150**, Marcel Dekker, New York (1985).
4. J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **6**, 610 (1995).
5. J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **8**, 473 (1997).
6. S. K. Lee, J. W. Han, B. H. Kim, P. G. Shin, S. K. Park, and J.C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **10**, 537 (1999).
7. H. K. Ko, B. D. Park, and J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., 11, 679 (2000).
8. J. G. Lee, S. S. Bae, I. S. Cho, S. J. Park, B. D. Park, S. K. Park, and J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **16**, 664 (2005).
9. J. G. Lee, S. S. Bae, I. S. Cho, S. J. Park, B. D. Park, S. K. Park, and J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **16**, 677 (2005).
10. J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **16**, 778 (2005).
11. S. Lee, B. J. Kim, J. G. Lee, and J. C. Lim, J. Kor. Ind. Eng. Chem., **16**, 778 (2011).
12. D. H. Daniels, C. R. Warner, S. Selim, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65, 162, (1982).
13. J. M. Murphy, C. C. Scott, Analyst **94**, 481(1969).
14. T. H. Tani, J. M. Moore, T. W. Patapoff, J. Chromatogr. **A 786**, 99 (1997).
15. C. Crescenzi, A. Di Crocia, R. Samperi, Anal. Chem. **67**, 1797 (1995).
16. M. Castillo, F. Ventura and D. Barcel, Waste Manage. 19, 101 (1999).
17. K. A. Krogh, K. V. Vejrur, B. B. Mongensen and B. Halling-Sørensen, J. Chromatogr. A 957, 45 (2002).
18. M. M. Ahel and W. Giger., Anal. Chem. 2584 (1985).
19. M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi, J. Chromatogr. A 904, 65(2000).
20. A. M. Rothman., J. Chromatogr. 253, 283 (1982).
21. C. Sun, M. Baird, Hamish A. Anderson, Donald L. Brydon, J. Chromatogr. A, 145 (1997).
22. A. Marcomini, M. Zanette, J. Chromatogr. A 193 (1996).
23. M. Ahel and W. Giger. Anal. Chem. 57, 2584 (1985).
24. A. M. Rothman. J. Chromatogr. 283 (1982).
25. Cheng Sun, Margot Baird, Hamish A. Anderson, Donald L. Brydon, J. Chromatogr. A , 145 (1997).
26. R. E. A. Escott and M. Mortimer, J. Chromatogr, 423 (1991).
27. Chin-Yuan Cheng, Wang-Hsien Ding, J. Chromatogr, A, 143 (2002).
28. F. I. Portet, C. Treiner, P. L. Desbène. J. Chromatogr. A878, 99 (2000).
29. Marieta Balcan, ColloidsSurf. A, 221, 1 (2003).
30. Klaus Rissler. J. Chromatogr. A, 1 (1996).
31. P. L. Desbène, F. I. Portet, G. J. Goussot. J. Chromatogr. A, 730, 209 (1996).
32. G. Cretier, C. Podevin and J. -L. Rocca.

- J. Chromatogr. A, 305 (2000).
33. Lakshmy M. Nair, Norma V. Stephens, Sarah Vincent, Neervalur Raghavan, Patrick J. Sand. D, J. Chromatogr. A, 81 (2003).
34. Hong Soon Park, Ho Ryul Ryu, Choong Kyun Rhee. Talanta, 70, 481 (2006).
35. Hong Soon Park, Choong Kyun Rhee. J. Chromatogr. A, 289 (2004).