

LC/ESI/MS 와 기능성 화장품 관련 분석에의 응용

이명희

대전보건대학 화장품과학과

요 약

LC/MS 는 HPLC 의 분리능과 질량분석기의 화합물의 확인 능력을 결합시킨 기기이다. 여기서 사용되는 이온화 방법은 GC/MS 에서 사용되어지는 전자이온화법(electron ionization, EI)이나, 화학이온화법(chemical ionization, CI)은 부적당하기 때문에 최근 개발되어진 연성 이온화법의 대표적인 고속원자폭격식(Fast atom bombardment, FAB)이나 전기분무이온화식(electrospray ionization, ESI) 등이 사용되고 있다. 이중 전기분무이온화법은 고속원자폭격법에서 사용되는 매트릭스를 사용하지 않기 때문에 매트릭스 이온의 부재로 인한 낮은 바탕 신호, 오래 지속되면서 안정된 초기 이온 전류, 샘플링의 용이성, HPLC 와의 더 좋은 호환성 등의 장점을 제공한다. 이러한 전기분무이온화 방법은 극성이 매우 크거나 휘발성이 낮은 물질로 보통의 EI 나 CI 이온화 방법으로 분석이 어려운 물질들을 분석할 수 있다. 또한 열에 불안정하거나 분자의 분자량이 큰 단백질 등의 분석도 가능하다. 이러한 LC/ESI/MS 방법을 이용하여 열에 불안정하고 극성이면서 분자량이 커서 GC/MS 로의 분석이 어려운 기능성 화장품 원료로 주목 받고 있고 생체에 존재하는 지질 성분으로 알려진 레시틴과 세라마이드의 분석이 가능함을 소개하고 분리와 동시에 그 분자량과 구조에 대한 정보를 빠르게 얻을 수 있음을 소개하였다.

서 론

최근 기능성 화장품의 개발 및 그 제품 평가에 많은 관심들이 집중되어 지고 있다. 제품의 기능을 보증한다는 것은 제품에 사용된 원료의 안정성 및 그 기능이 우선 확인되고 보장되어야 하는 품질 관리는 물론 제품 자체에서의 안정성 및 효능을 보증할 수 있는 품질 관리가 요구되어진다. 이러한 시점에서의 화장품 원료 및 제품 분석의 중요성이 강조되지 않을 수 없다. 따라서 이러한 기능성 원료로 주목 받고 있는 원료중에서 레시틴 및 세라마이드의 새로운 분석법을 소개하고자 한다. 레시틴은 셀의 구성 성분이기도 하고, 셀의 membrane penetration 에 관여하여 중요한 역할을 하고 있다. 이것은 오랫동안 화장품 산업에서 천연 계면활성제로 널리 사용되었다. 인지질의 조성 차이에 따라 화학적 물리학적 성질이 달라진다고 일반적으로 알려져 있다. 이러한 인지질은 여러 분야에서 관심의 대상이 되어 오고 있다. 예를 들면, chemotaxonomical 연구 분야에서 biomarker 로서, 화장품과 의약품 분야에서 리포솜(liposome)을 제조하기 위하여 연구하고 있다. 생화학적 막(biological membrane), 화장품 제조(skin-care formulation), 의약품 전달과 정(drug delivery)등의 분야에서 인지질(phospholipid)의 상업적 용도가 증가하고 있다. 화장품에서는 리포솜이 피부에 필요한 활성 성분들을 캡슐화 하여, 활성 성분들이 피부 세포에 직접 적용될 수 있도록 하는 단계까지 발전해 있다. 화장품과 의약품에서의 리포솜은 대부분 phosphatidylcholine 을 주성분으로 한 천연 인지질, semisynthetic, 또는 합성된 인지질을 이용하여 만들어 진다. 이들 인지질에는 phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylinositol(PI), phosphatidylserine(PS) 그리고 phosphatidic acid 등이 소량으로 포함 되어 있다. Phospholipids 의 fatty acids 부분의 이중결합이 수소 첨가 반응에 의하여 포화된 정도에 따라 부분적으로 수소화된 phospholipids 와 완전히 포화된 phospholipids 로 구분이 된다. Tagawa 외 여러 사람들은 레시틴의 수소화가 이들이 산화하는 것을 방지할 수 있다고 보고 하고 있다. 더 나아가서 이들은 수소화된 레시틴으로 만들어진 리포솜이 좀 더 안정성이 있고 흡수를 향상 시킬 수 있는 유효성과 효과가 있음을 밝혔다. 그 리포솜의 안

정성은 *phosphatidylcholine* 의 함량과 이를 구성하고 있는 *fatty acids* 의 포화된 정도와 밀접한 관계를 갖고 있다. 그러므로, 리포솜을 생성하는 때는 인지질의 정확한 분자조성을 확인 할 수 있는 선택성 있고, 감도 높은 분석방법이 필요하다.

신체 세포의 막들은 주로 *phospholipid* 로 구성되어 있지만 피부 각질층의 막은 주로 세라마이드(*ceramide*)로 이루어져 있다. 세라마이드는 *sphingolipid* 의 한 *group* 이며, *sphingolipid* 는 *phospholipid* 보다 안정한 *amide* 결합으로 이루어져 있다. 이 세라마이드의 역할은 콜레스테롤과 다른 *lipid* 들로 구성된 표피층에서 보습 등의 중요한 피부 보호 기능을 담당하고 있다. 최근의 세계 유수의 화장품 회사의 연구에 의하면 세라마이드 또는 이의 생합성 경로 중간체를 피부에서 공급하여 줌으로써 결핍된 세라마이드를 보충하거나 피부 세포가 직접 세라마이드를 합성할 수 있도록 자극 할 수 있다는 사실이 보고 되고 있다(U.S. Patent No.5578641). 따라서 세라마이드와 생합성 경로 중간체들의 공급은 이의 부족으로 발생하는 건성 피부화, 각질화를 막아 주고 보습 효과와 피부의 재생을 도와주는 작용을 하므로 기초화장품의 원료뿐만 아니라 색조 화장품에도 기초 소재로 주목 받고 있는 중요한 기능성 원료 중의 하나이다.

지금까지 이들의 일반적인 분석 방법으로는 TLC, NMR, HPLC, GC 등으로 분석을 하여 왔다. TLC 법은 단지 Rf 값으로 정성을 할 수 있을 뿐이고, NMR 의 경우 혼합물인 경우와 그 농도가 낮으면 분석이 불가능해 진다. HPLC 의 경우도 표준물질과의 비교로 머무름 시간이 일치하는지 정도의 정성이 가능하며 꼭 표준물질이 있어야 확인이 가능한 단점을 갖는다. GC 를 이용하는 분석법 또한 휘발성이 없는 레시틴과 세라마이드의 분석을 하려면 복잡한 전처리 과정을 거쳐야 하며 긴 분석 시간을 필요로 하는 단점을 가지고 있다.

GC/MS 를 이용하여 분석하려면 휘발성이 있는 화합물이어야 한다. 극성 그룹을 갖고 있어 휘발성이 없는 경우, 휘발성 유도체를 만들어 분석이 가능하기도 하다. 그러나, LC/MS 를 사용하면 비휘발성 화합물을 유도체화 없이 직접 분리하여 검출이 가능하다. 지금까지 GC/MS 로 분석이 어려웠던 극성, 이온성, 비휘발성, 분자량이 크거나, 열적으로

불안정한 시료를 LC/MS 를 이용하면 단순한 추출 등의 전처리만으로 보다 빠르고 정밀하게 크로마토그램을 얻을 수 있다. 이러한 장점을 갖기 위해서 LC/MS 에서는 휘발성이 없거나 열적으로 불안정한 시료를 안정한 조건에서 기체상으로 전환시키는 것이 중요하다. 열적으로 불안정한 분자에 큰 양의 내부에너지가 가해지면 많은 분해 이온이 생성되어 분자량에 대한 정보를 얻을 수 없기 때문에 이를 방지 할 수 있는 조건하에서 이온화가 되어야 한다.

보통 GC/MS 에 연결되어 사용되는 이온화 방법으로 EI(electron ionization)와 CI(chemical ionization)방법이 있다. EI 에서는 가열에 의해 생성된 시료 기체 분자와 고속 전자 간의 충돌에 의해서 이온화가 일어난다. CI 방법은 가열에 의해 생성된 시료 기체 분자와 이온화된 시약(CH_4 gas) 기체 분자가 반응하여 이온이 생성된다. EI 와 CI 방법은 기체화하고 이온화하는 데 큰 양의 내부에너지가 가해지므로 열적으로 불안정하고 극성인 분자량이 큰 예를 들면 당, 단백질과 지질(lipids) 같은 천연물을 분석 하는데 적합하지 않다.

이러한 문제점을 보완하기 위해 LC/MS 에서는 최근 연성이온화법(soft ionization)을 이용하여 시료를 기체상으로 만들어 탈착시키는 방법을 이용하고 있다. 연성이온화법 인터페이스로는 고속원자폭격식(fast atom bombardment, FAB)과 전기분무식(electrospray ionization ESI)을 대표적인 예로 들 수 있다. 고속원자폭격식에서의 단점인 매트릭스 혼합의 번거로움이 없고 검출 한계가 보다 높은 최근 개발된 전기분무식 이온화법의 원리와 이 방법을 이용한 화장품 관련 분석에 대한 응용에 대하여 소개하고자 한다.

(1) 전기분무 과정 (Electrospray process)

전기분무식 인터페이스 개략도와 이온 생성 과정은 다음 figure 1 과 figure 2 의 그림과 같다. 분석 용액이 3~5KV 의 높은 전압이 걸린 capillary 를 통과하게 된다. 분석 용액이 용출 될 때 높은 전기장의 효과로 높은 전하를 띤 미세한 방울은 전압과 압력 변화에 따라 질량분석기(mass spectrometer)의 분석 부분(analyzer portion)으로 이동된다. 이 과정은 대기압하에서 일어나며, 이때 건조한 질소 기체가 시료 채취구 뒤쪽을 통과하면서 용매

를 증발시켜 질량분석기의 분석 부분으로 들어 가는 것을 방지 한다.

미세 방울에서 이온 기체가 발생하는 과정은 다음과 같이 자세히 설명될 수 있다. 미세 방울에서 용매가 연속적으 증발되고 쿨롱 반발력(coulomb explosion)이 작용하여 더 작은 크기의 방울로 분쇄되어 그 크기가 점점 더 작아진다. 방울의 크기가 감소하는 현상은 방울 표면의 전기장이 시료 이온을 기체 상태로 탈착시킬 만큼 충분히 강해질 때까지 계속되어 한계점에 이른다. 이때 내부 전하간의 반발력이 액체 방울의 표면장력보다 크게 되어 이온이 발생하게 된다. 지속적으로 연속적인 방울 크기의 감소는 결국 single ion 방울로부터 용매의 휘발로 기체 상태의 이온이 유도되어 질 수 있다. 이 single ion 방울의 상대적인 중요성과 이온 증발 과정은 여전히 논의 연구과제로 남아 있다.

(2) 전기 분무 생성 이온의 성질

① 전기 분무 생성 이온의 전하 상태 : 전기분무이온화법을 사용하면 분자량이 100 이하의 극성 화합물로부터 수십만까지의 고분자 화합물의 분석이 가능하다. 또한, 전기 분무식 인터페이스는 양이온, 음이온 모드로 이용될 수 있다. 일반적으로 분자량이 1000 이하의 화합물들은 단일 전하를 가지고 수소가 부착된 $[M + H]^+$ 이온이 생성되고 알칼리 금속이 첨가된 유사 분자 이온인 $[M + Na]^+$, $[M + K]^+$ 로 양이온 모드에서 관찰된다. 음이온 모드에서는 탈수소화된 음이온 $[M - H]^-$ 을 쉽게 형성하는 산성 시료 분석 등에 장점이 있다.

1000 이상의 큰 분자량을 갖는 예를 들면 peptide, protein, oligosaccharide 화합물인 경우 질량스펙트럼은 다수의 전하를 띠는 분자 이온들이 일련의 시리즈로 나타내는 분포를 보인다. 단백질의 분자량이 30,000 이고 전하가 20 인 경우를 예로 보면, 분자가 수소화되어 이온을 $[M + 20]^{20+}$ 의 조성을 나타내며 $m/z = [M + 20]/20 = 1501$ 에서 피크가 나타난다. 따라서 보통 사중극자나 부채꼴형 질량분석기에서 측정되는 분자량 범위 밖에 있는 큰 분자량의 분자들의 질량스펙트럼을 얻는 것이 가능하다.

② 분해 이온의 생성 : 분자량의 정보만으로는 화합물의 구조를 결정할 수가 없다. 그러나 시료 채취구와 스키머의 영역에 가해진 전압을 변화 시키면서 전압에 따라 질량

분석기로 진행하는 분자 이온들을 가속화 할 수 있다. 전압을 증가 시킬 경우 전기 분무기 끝에서 생성된 시료 분자 이온들을 가속화 되어 큰 운동에너지를 가지고 대기중의 기체와 충돌하게 된다. 시료 분자 이온은 충돌을 통해 공유결합이 끊어질 정도의 충분한 에너지를 얻어 분해 이온을 생성한다. 분해 이온의 분석으로 분자 이온의 구조에 대한 정보를 얻을 수 있다. 이것을 이온화실 내의 충돌유발반응(collision ion dissociation, CID)이라 한다.

실 험 방 법

레시틴의 분석

표준시약

1-stearoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine, 1-palmitoyl-2-oleyl-sn-glycero-3-phosphatidylethanolamine, 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphatidylserine 와 L- α -phosphatidyl-inositol from soybean 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 모든 시약은 chloroform/methanol(1:2) 용매에 녹여 1.5×10^{-10} mol/ μ l의 농도로 하였다.

시료

Hydrogenated Lecithin(Nikko lecinol S-10)은 Nikko chemicals CO., LTD., Japan에서 구입하였다. 시료 200mg을 취하여 chloroform/methanol(1:2)용매 10ml에 녹이고, 50ml 메스플라스크에 옮기고, 같은 용매로 표선을 맞춘다. 시료 용액은 3000rpm에서 5분간 원심분리기로 원심 분리한 후, 상등액을 취하여 HPLC system에 직접 주입하였다.

액체 크로마토그래피

액체 크로마토그래피 장치는 Hewlett-Packard Model 1050 solvent delivery system(Palo Alto, CA, USA)과 20 μ l sample loop(Rheodyne, CA, USA)를 포함하는 Rheodyne 7125 주입기(injector)로 구성되었다. 분리에 사용한 컬럼은 micro-column, 250 x 1.0mm i. d. CAPCELL

PAK C₁₈(Shiseido, Japan)을 사용하였다. 용매의 유속은 0.08ml/min로 하였다. 분석을 하기 전에 컬럼은 0.1M 암모늄 아세테이트 수용액으로 5분간 흘려준 후, 분석 용매 조건으로 20분간 흘려 준 후 분석을 하였다. 이동상의 용매 조건은 0.5% 수산화암모늄 메탄올 : 아세토니트릴 : 0.1M 암모늄 아세테이트 수용액 비율을 97:2:1로 하였다.

질량 분석

질량 분석은 전기분무 이온화원이 갖추어진 VG Quattro triple quadrupole mass spectrometer(Fisons Instruments, VG Organic, Altrincham, UK)를 사용하였다. 전기분무 이온화 과정에서 capillary 끝은 -2.26KV(ES-), +3.35KV(ES+)로 하여 용액을 통과시켜 질량분석기에 도입하였다. 이온원의 온도는 70°C로 하였다. 건조 가스와 nebulizing 가스는 질소 가스를 사용하였고, 유속은 각각 15ℓ /hr 그리고 500ℓ /hr로 하였다. 음이온과 양이온 모드에서 m/z 50에서 1000범위의 스펙트럼을 얻을 때의 scan 속도는 167mass unit/s이고, 분해능은 1amu였다. 데이터 처리는 VG MassLynx data system을 사용하였다.

세라마이드의 분석

표준시약

Ceramide III(N-stearoyl-phytosphingosine), Ceramide IIIb(N-oleoyl-phytosphingosine) 시약은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 모든 시약은 chloroform/methanol(1:2) 용매에 녹여 1.5×10^{-10} mol/μl의 농도로 하였다.

시료

세라마이드(DS-ceramide Y30)은 두산에서 생산된 것을 사용하였다. 시료 250mg을 취하여 chloroform/methanol(1:2)용매 10ml에 녹여 50ml 메스플라스크에 옮기고, 같은 용매로 표선을 맞춘다. 시료 용액은 3000rpm에서 5분간 원심분리기로 원심 분리한 후, 상등액을 취하여 HPLC system에 직접 주입하였다.

액체 크로마토그래피

액체 크로마토그래피 장치는 Hewlett-Packard Model 1050 solvent delivery system(Palo Alto, CA, USA)과 20 μ l sample loop(Rheodyne, CA, USA)를 포함하는 Rheodyne 7125 주입기(injector)로 구성되었다. 분리에 사용한 컬럼은 micro-column, 250 x 1.0mm i. d. CAPCELL PAK C₁₈(Shiseido, Japan)을 사용하였다. 용매의 유속은 0.05 ml/min로 하였다. 분석을 하기 전에 컬럼은 50mM 암모늄 아세테이트 수용액으로 흘려준 후, 이동상의 용매 조건은 50mM 암모늄 아세테이트 메탄올 : 아세토니트릴 : 0.1% 개미산 수용액 비율을 90 : 5 : 5로 하였다.

질량 분석

질량 분석은 전기분무 이온화원이 갖추어진 VG Quattro triple quadrupole mass spectrometer(Fisons Instruments, VG Organic, Altrincham, UK)를 사용하였다. 전기분무 이온화 과정에서 capillary 끝은 -2.26KV(ES-), +3.35KV(ES+)로 하여 용액을 통과시켜 질량분석기에 도입하였다. 이온원의 온도는 90°C로 하였다. 건조 가스와 nebulizing 가스는 질소 가스를 사용하였고, 유속은 각각 15 ℓ /hr 그리고 500 ℓ /hr로 하였다. 음이온과 양이온 모드에서 m/z 50에서 1000범위의 스펙트럼을 얻을 때의 scan 속도는 167mass unit/s 이고, 분해능은 1amu였다. 데이터 처리는 VG MassLynx data system을 사용하였다.

실험 결과 및 고찰

화장품 원료인 hydrogenated lecithin에서 phospholipids의 확인

복잡한 혼합물의 분석에서는 검출하기 전에 분리 조작이 필요하다. 따라서 새로운 HPLC 용매 조건으로 각 화합물을 분리하고자 하였다. 이전에 HPLC/ESI-MS를 이용한 phospholipid 분석에 대한 보고가 있었지만, 한가지 용매 조건(isocratic solvent system)에서 역상 크로마토그래피 방법을 이용하여 각 그룹과 동일 그룹의 분자중 사이의 분리가

가능했던 방법은 없었다. 기울기 용리를 하는 용매 조건은 분리하는 동안 분자 이온의 세기(intensity) 변화와 baseline에 영향을 미치게 된다. 새로운 한가지 용매를 사용하는 분리 조건에서는 baseline이 안정되어 있다. 그러므로 이 조건은 크로마토그래피 분석을 하는 동안 질량 검출에서의 감도가 일정하게 유지된다.

0.5% 수산화암모늄 메탄올 용매를 이동상으로 사용하였을 때는 분리가 잘 되지 않았다. 그래서 이동상을 0.5% 수산화암모늄 메탄올 용매, 아세토니트릴, 0.1M 암모늄 아세테이트 수용액을 97 : 2 : 1 의 비율로 혼합한 용매를 사용함으로써 화합물들을 분리할 수 있었다. 암모늄 아세테이트가 피크 모양을 향상 시켜 주므로, 분석하기 전에 0.1M 암모늄 아세테이트 용매로 5분 동안 컬럼을 씻어 주고, 이동상을 약 30분간 흘려 주어 컬럼 조건을 조절하여 주었다. 이러한 조건으로 컬럼 상태를 조절하여 꼬리 끌기 현상을 최소화하고 적당한 분리 조건을 얻을 수 있었다. 이러한 조건으로 hydrogenated lecithin 시료에서 phospholipids 분자종들을 전기분무 이온화원과 연결된 LC/MS 방법으로 분석 하기에 충분하였다.

Figure 3과 figure 4는 화장품 원료인 lecithin을 본 실험에서 이용한 새로운 크로마토그래피 조건으로 분리한 결과를 나타내고 있다. Figure 3은 양이온 모드 CV 100V에서의 full-scan ESI-MS 크로마토그램이다. 크로마토그래피 분리 조건에서, 양이온 모드로 CV 100V의 full-scan ESI-MS 크로마토그램을 보면, PC 그룹과 PE 그룹의 분자종은 주로 $[M + H]^+$ 분자 이온이 주로 생성되고, PI 그룹은 $[M + Na]^+$ 나트륨 부가 분자 이온이 주로 생성되는 것을 알 수 있다. 또한, cone voltage를 높이는 방법의 이온원 CID 방법으로, CV 100V에서 구조적인 정보를 제공해 주는 분해 생성 이온 스펙트럼을 얻었다. Figure 4는 음이온 모드 CV 60V에서의 full-scan ESI-MS 크로마토그램이다. 음이온 모드, CV 60V에서 측정된 ESI-MS 크로마토그램에서 PI 그룹과 PE 그룹은 $[M - H]^-$ 분자 이온으로 검출이 되고, PC 그룹은 $[M + CH_3COO]^-$ 유사 분자 부가 이온으로 검출되었다. 또한, 이온원 CID 방법으로, CV 60V에서 구조적인 정보를 주는 분해 생성 이온 스펙트럼을 얻었다. 이때 양이온과 음이온 크로마토그램은 50amu에서 1000amu까지 full-

scan 을 하여 얻었다. 유속 0.08ml/min으로 하여 50분 동안 7종류의 분자종을 분리 하여 검출 하였다. 음이온과 양이온 모드에서 full-scan ESI-MS 크로마토그램의 각 피크에서의 질량 스펙트럼을 분석함으로써 각 분자종들의 구조를 결정할 수 있었다.

Phosphatidylinositol

양이온 모드 full-scan ESI-MS 스펙트럼에서 역시 PI그룹에 대한 정보를 얻을 수 있었다(Figure 4). Figure 5a 와 Figure 5c는 PI 이온 부가물의 이온원 CID방법으로 생성된 분해 생성 이온 스펙트럼이다. 이 스펙트럼에서는 m/z 578([M-259]⁺, figure 3a) 와 m/z 580 ([M-259]⁺, figure 3c) 피크가 가장 세게 나타났고, 이 피크들은 PI 분자에서 phosphoinositol head group이 제거된 diglyceride(DG)에 해당하는 피크이다. Figure 5a의 m/z 860과 figure 5c의 m/z 862 [M+Na]⁺ 이온은 lecithin에서 PI분자에 나트륨 이온이 하나 부과된 분자 부가 이온에 해당한다. Figure 4는 음이온 모드 full-scan ESI-MS 크로마토그램이고, 이 크로마토그램에서 PI 영역에 m/z 836와 m/z 838 두 피크가 주 피크로 나타났다. 이 PI 화합물들의 분해 생성 이온 스펙트럼인 figure 5b 와 figure 5d에서는 이 화합물들의 특성 피크인 m/z 241(inositolphosphate-H₂O)을 볼 수 있다. 이 분해 생성 이온 스펙트럼을 이용하면 두 아실 치환기와 분자량을 확인 하는 것이 가능하다. Figure 5b 와 figure 5d는 m/z 836와 m/z 838인 [M - H]⁻ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼을 나타내고 있다. m/z 836 [M - H]⁻ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼에서 아실 치환기를 나타내는 m/z 255(C16:0)와 m/z 281(C18:1)의 피크가 우세하게 나타났다. 두 피크의 상대 세기(relative abundance)를 비교하여, C16:0이 상대 세기가 더 크므로 sn-1 위치이고, C18:1이 sn-2 위치의 치환기임을 확인 할 수 있었다.¹⁴ m/z 838의 분해 생성 이온 스펙트럼 역시 동일한 현상을 나타내었다.

Phosphatidylethanolamine

양이온 모드 full-scan ESI-MS 크로마토그램의 각 피크들의 질량 스펙트럼으로부터 PE 그룹에 대한 정보를 얻을 수 있었다. Figure 6a 와 6c는 PE 이온 부가물들의 이온원 CID방법에 의해서 생성된 분해 이온 스펙트럼이다. 이 스펙트럼에서 m/z 580([M-140],

figure 4a)와 m/z 608($[M-140]$, figure 6c) 피크가 가장 세게 나타났고, 이 피크들은 PE 분자에서 phosphoethanolamine head group이 제거된 diglyceride(DG)에 해당하는 피크이다. Figure 6a의 m/z 743와 figure 6c의 m/z 771 $[M+Na]^+$ 이온은 lecithin에서 PE 분자에 나트륨 이온이 하나 부과된 분자 부가 이온에 해당한다. Figure 4는 음이온 모드 full-scan ESI-MS 크로마토그램에서 PE 영역에 m/z 719, m/z 745, m/z 747이 주 피크로 나타나고, 분해 생성 이온을 스펙트럼으로부터 분자량과 아실 치환기를 확인 할 수 있었다. m/z 718과 m/z 746 $[M - H]^-$ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼을 figure 6b와 figure 6d에 나타내었다. m/z 718 $[M - H]^-$ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼에서는 아실 치환기를 나타내는 m/z 255 (C16:0)와 m/z 283(C18:0)의 피크가 우세하게 나타났다. 두 피크의 상대 세기(relative abundance)를 비교하여, C16:0이 상대 세기가 더 크므로 sn-1 위치이고, C18:0이 sn-2 위치의 치환기임을 확인 할 수 있었다. m/z 747(figure 4d)와 m/z 745 $[M - H]^-$ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼에서 동일한 결과를 관찰 할 수 있다.

Phosphatidylcholine

Fig 3의 크로마토그램에서는 PC 분자에 수소 이온이 부과된 m/z 791과 m/z 763 피크가 주 피크로 검출 되었다. m/z 763 과 m/z 791 $[M+H]^+$ 두 이온의 이온원 CID 분해 생성 이온 스펙트럼에서는 m/z 184 피크가 가장 우세하게 나타났다. Figure 7a와 figure 7c에서 m/z 184 피크는 PC 분자의 조각 이온인 $[H_2PO_4CH_2CH_2N(CH_3)_3]^+$ 에 해당한다. 보통 낮은 에너지 CID ESI/MS/MS PC 스펙트럼에서는 m/z 184 하나의 분해 생성 이온이 발견되는 것으로 알려져 있다. 음이온 모드 full-scan ESI-MS 크로마토그램 figure 4에서는 PC 영역에 m/z 849, m/z 821 피크가 주 피크로 나타났다. 음이온 분해 생성 이온 스펙트럼을 이용하면 두 아실 치환기와 분자량을 확인 하는 것이 가능하다. Figure 7b와 figure 7d는 m/z 849, m/z 821 $[M + CH_3COO]^-$ PC 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼을 나타내었다. m/z 849 $[M + CH_3COO]^-$ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼은 아실 영역에서 m/z 283(C18:0) 피크만 우세하게 나타났다. 이는 C18:0 fatty acid가 sn-1과 sn-2 위치에 모두 치환된 것임을 나타낸다. m/z 821 $[M + CH_3COO]^-$ 이온의 분해 생성 이온 스펙트럼에서는 아실

영역에서 m/z 255(C16:0)와 283(C18:0)가 주피크로 나타났다. 상대 세기를 비교해 본 결과 C16:0이 sn-1 위치의 치환기이고, C18:0이 sn-2 위치에 치환기임을 알 수 있었다. 또한, PC임을 확인할 수 있는 분해 생성 이온은 $[M - 15]$, $[M - 60]$ 그리고 $[M - 86]$ 이온이 특징적으로 나타나는 것을 figure 7b와 figure 7d 스펙트럼에서 볼 수 있다.

세라마이드의 분석

실험에서 사용되어진 화장품 원료로 사용한 세라마이드는 그 합성 과정이 세라마이드의 생합성 중간체인 TAPS(tetraacetylphosphingosine)를 효모로부터 추출한 후 이를 deacetylation 과정을 거쳐 phytosphingosine 을 만들고 여기에 N-acylation 과정을 거치게 된다. 이때 N-acylation 과정에서 fatty acid 의 혼합물에 의해 alkyl 의 길이가 다른 화합물들이 혼재하게 된다. 따라서 분석해 본 결과 figure 8 의 크로마토그램에서 그 혼합물들이 각각 분리되어 나타나는 것을 확인 할 수 있다. Figure 8 은 양이온 모드 CV = 60V 에서 얻은 크로마토그램을 보면 분자 이온들은 $m/z = [M + H]^+$ 이온으로 검출되었다. MW = 582 (ceramide IIIb)의 함량이 가장 많고, MW = 580, 556, 554, 528 의 분자량을 갖는 화합물들이 상대적으로 적은 양 포함되어 있음을 알 수 있다. 또한 이러한 사실은 figure 9 의 음이온 모드 CV = -80V 에서 얻은 크로마토그램을 보면 분자 이온들이 $m/z = [M - H]^-$ 이온으로 검출되는 것을 확인 할 수 있다. 따라서 다시 한번 알킬기가 다른 세라마이드의 종류를 확인 할 수 있다. 그리고 세라마이드와는 다른 종류의 화합물로 보이는 화합물이 가장 빠른 유지 시간에 MW = 346 분자량을 갖는 화합물로 검출되는 것을 확인 할 수 있다. 이는 추출 과정 또는 합성 과정에서 생성된 불순물로 보여 진다.

Figure 10 은 양이온 모드 CV = 60 에서 얻은 ceramide IIIb 의 ESI/MS/MS spectrum 이다. $m/z = 583$ 이온은 $[M + H]^+$ 분자 이온의 피크이고, $m/z = 565$ 이온은 $[M + H]^+ - H_2O$ 이온이며, $O' = O - H_2O$, $O'' = O' - H_2O$, $O''' = H_2O$ 의 이온 조각들이 주로 나타남을 알 수 있다. N-acyl chain 이 다른 화합물들도 즉 MW = 580, 556, 554, 528 모두 동일한 경향의 스펙트럼을 보이고 있다. 따라서 이들 세라마이드는 알킬기를 달리한 화합물들이 혼재하고 있음

을 확인 할 수 있었다.

결 론

화장품 원료 중 기능성 원료로 주목 받고 있는 lecithin 과 ceramide 원료에서 그 분자 종들을 확인 하는 유용한 방법이 역상 LC/ESI-MS 방법임을 알 수 있었다. 양이온 모드와 음이온 모드에서 분자 이온들을 확인하여 이 화합물들의 분자량을 확인 할 수 있었다. 동일한 용매 조건하에서 이들 혼합물의 분리가 가능했으며 이온원 CID 방법을 이용하여 분해 생성 이온 스펙트럼을 얻음으로써 구조적인 정보를 얻을 수 있었다. 이 결과로부터 이 분석 조건을 이용하여 화장품에서 lecithin 과 ceramide 의 분석에의 적용이 가능함을 알 수 있다. 또한 앞으로 그 중요성이 더욱 강조되어질 기능성 화장품 분야에서의 품질 관리에도 적용될 수 있다. 그리고 우리 피부에 존재하는 lipid 들로부터 이들을 추출하여 분석하는 것 또한 한국인 피부에 관하여 연구하고 이에 맞는 화장품의 개발을 하는데 좋은 기초 자료로 사용될 수 있으리라 기대된다.

참 고 문 헌

1. Simon J. Gaskell, *J. Mass Spectrom* , **32**, 677 (1997)
2. John B. Fenn, Matthias Mann, Chin Kai Meng and Shek Fu Wong, *Mass Spectrom. Revs.*, **9**, 37 (1990)
3. John B. Cunniff, and Paul Vouros, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **6**, 1175 (1995)
4. Alain Deroussent, Jean-Pierre Le Caer, Jean Rossier and Alain Gouyette, *Rapid commun. Mass Spectrom.*, **9**, 1 (1995)
5. S. George, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **40**, 51-60 (1989)

6. K. Larsson, *Lipids-Molecular organization, physiological functions and technical applications*, The Oily Press Ltd. (1994)
7. K. Suzuki and Kenichi Sakon, *Cosmetics & Toiletries*, **105**, 65 (1990)
8. H. Lautenschlager, *Cosmetics & Toiletries*, **105**, 89 (1990)
9. M. Tagawa, K. Shinosaki, Y. Kurata, K. Matsumoto, and Y. Tabata, 14th IFSCC vol. 1, 395-415 (1986)
10. N.J. Jensen, K.B. Tomer, and M.L. Gross, *Lipids*, **21**, 580-588 (1986)
11. N.J. Jensen, K.B. Tomer, and M.L. Gross, *Lipids*, **22**, 480-489 (1987)
12. A. Hayashi, T. Matsubara, M. Morita, T. Kinoshita, and T. Nakamura, *J. Biochem.*, **106**, 264- 269 (1989)
13. Y. H. Kim, J. S. Yoo, and M. S. Kim, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **18**, 874-880 (1997)
14. M. Careri, M. Dieci, A. Mangia, and P. Manini, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 775-780 (1996)
15. A. Å. Karlsson, P. Michelsen, Å. Larsen, and G. Odham, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 707-714 (1996)
16. S. Yoshida, and R. Namba, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **46**, 329-342 (1995)
17. H. Y. Kim, T. C. L. Wang and Y. C. Ma, *Anal. Chem.*, **66**, 3977-3982 (1994)
18. P. B. W. Smith, A. P. Snyder, and C. S. Harden, *Anal. Chem.*, **67**, 1824-1830 (1994)
19. D. D. Heller, C. M. Murphy, R. J. Cotter, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **60**, 2787-2791 (1988)
20. Rolf D. Petersen, *Cosmetics & Toiletries*, **107**, 45-49 (1992)
21. Federico Maria Rubino and Luigi Zecca, *Org. Mass Spectrom.*, **27**, 1357-1364 (1992)
22. Anders Å. Karlsson, Peter Michelsen and Goran Odham, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 1192-1198 (1998)

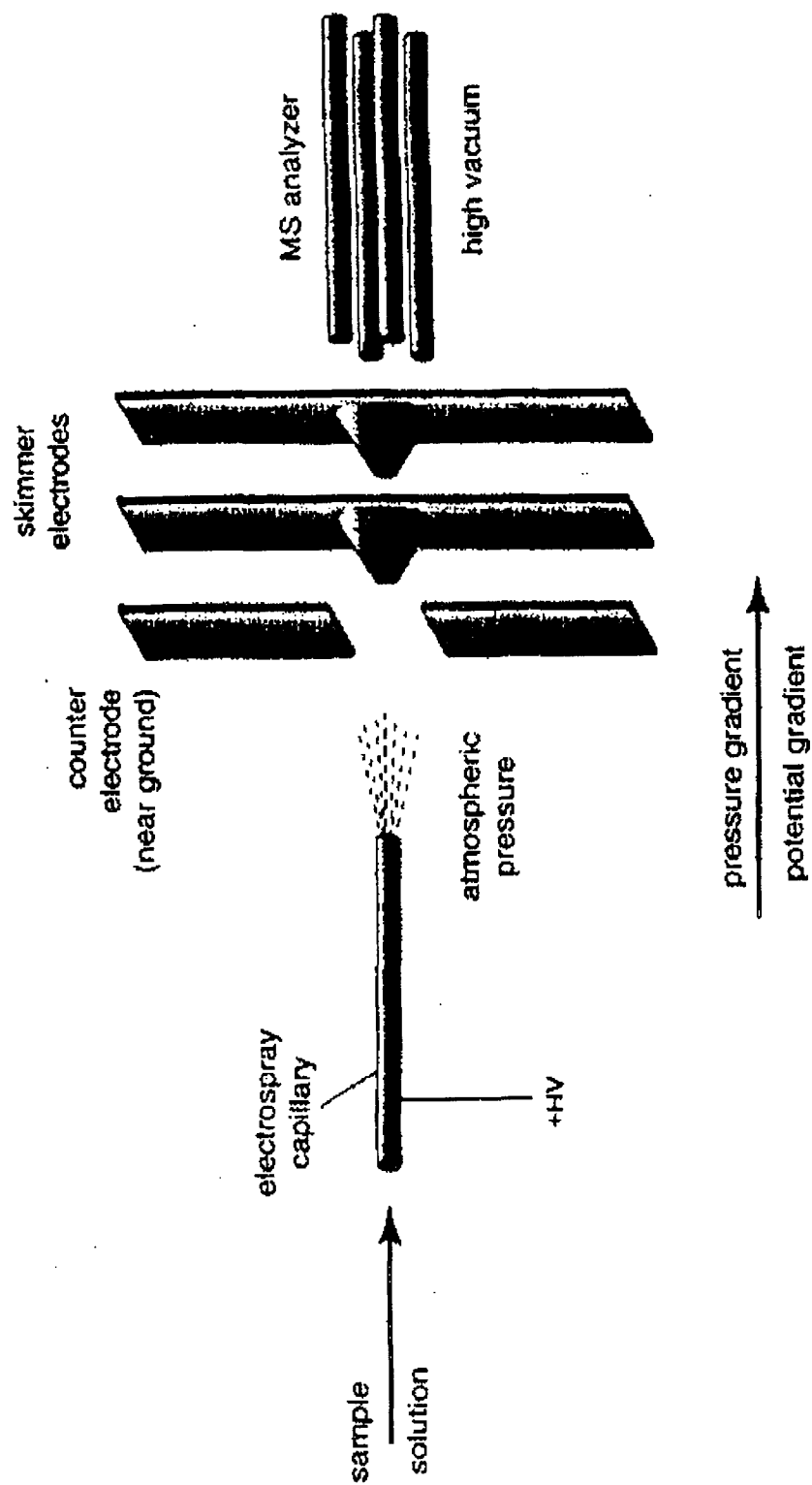


Figure 1. Essential features of the electrospray interface

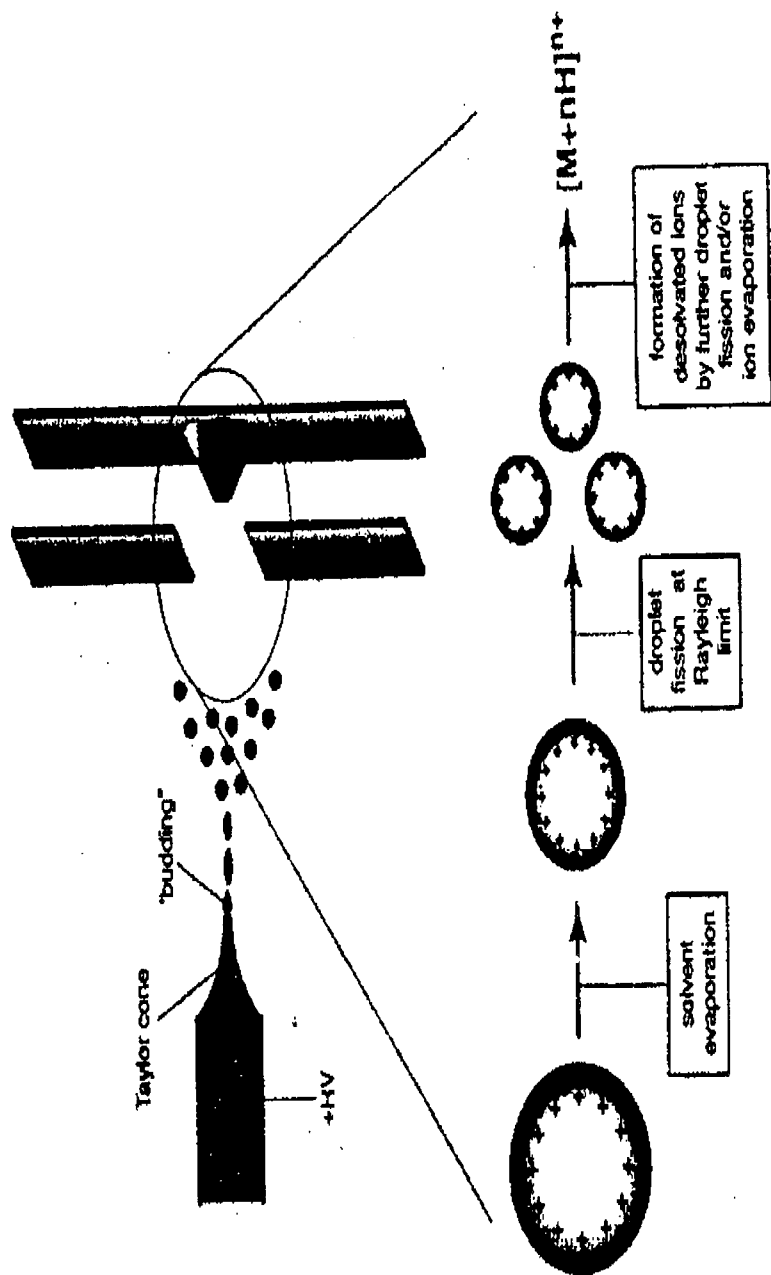


Figure 2. Droplet production in the electro spray interstage

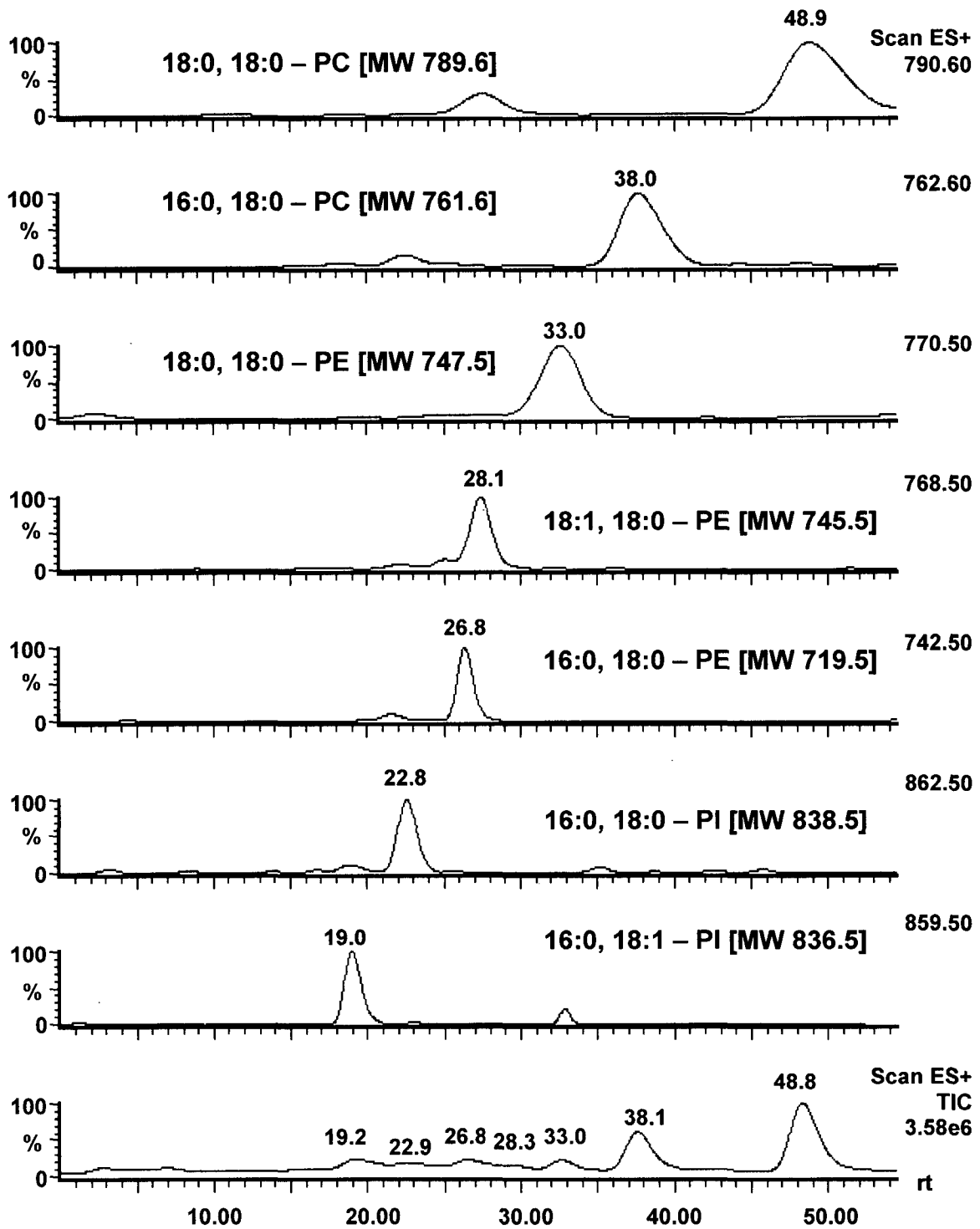


Figure 3. positive ion chromatograms obtained from lecithin (2ug) by selectively monitoring molecular or molecular adduct ions(cv=100V)

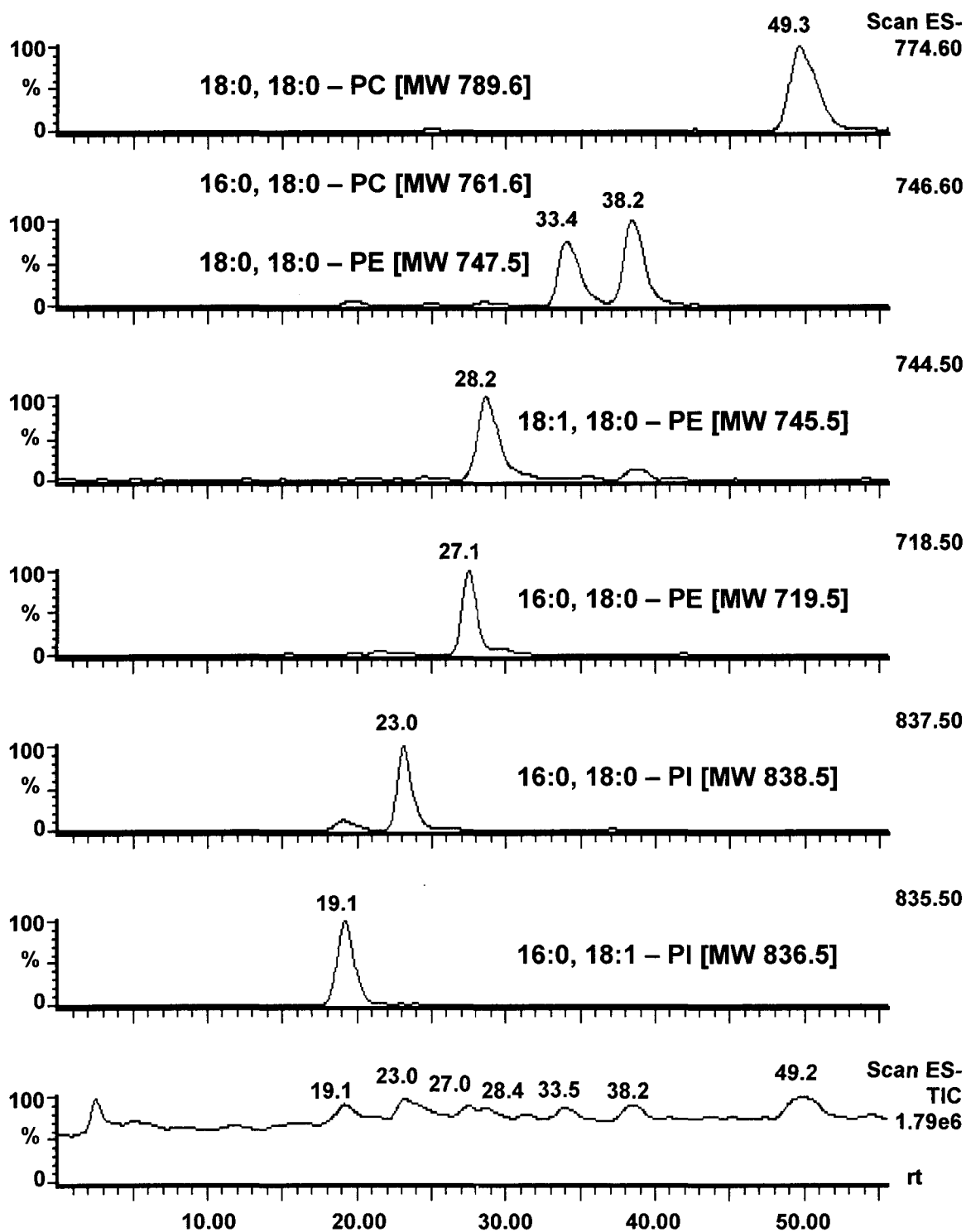


Figure 4. Negative ion chromatograms obtained from lecithin(2ug) by selectively monitoring molecular or molecular adduct ions (CV=60V).

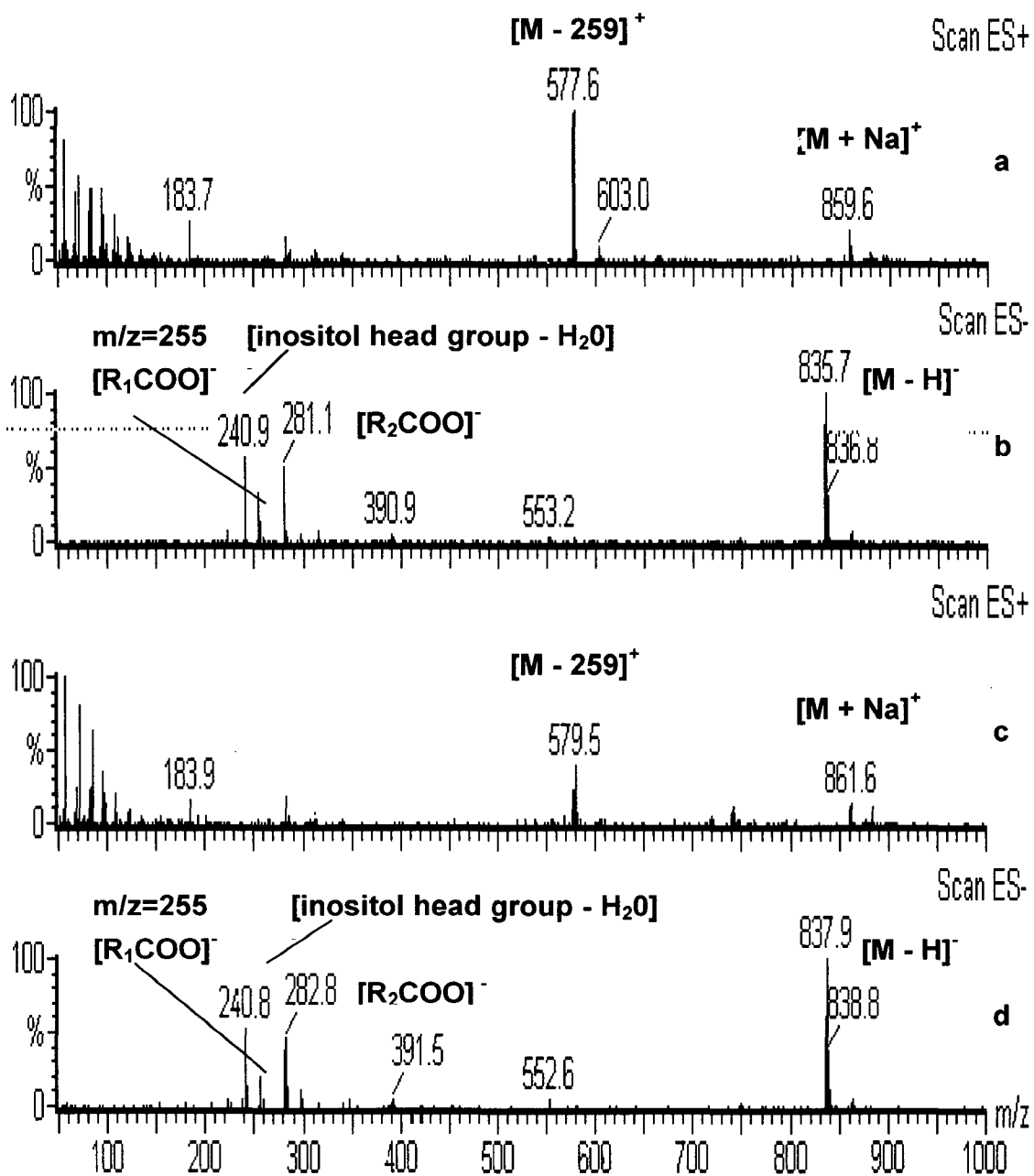
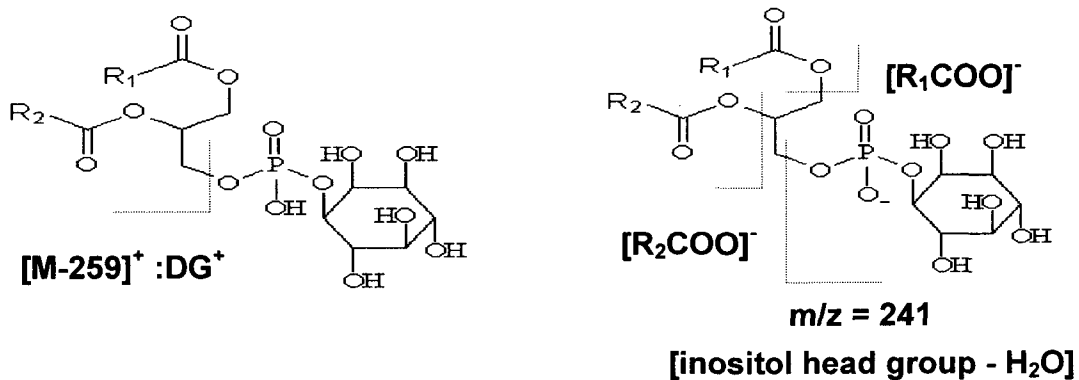


Figure 5. Mass spectra of (a) , (b) 16:0, 18:1-PI, (c), (d) 16:0, 18:0-PI

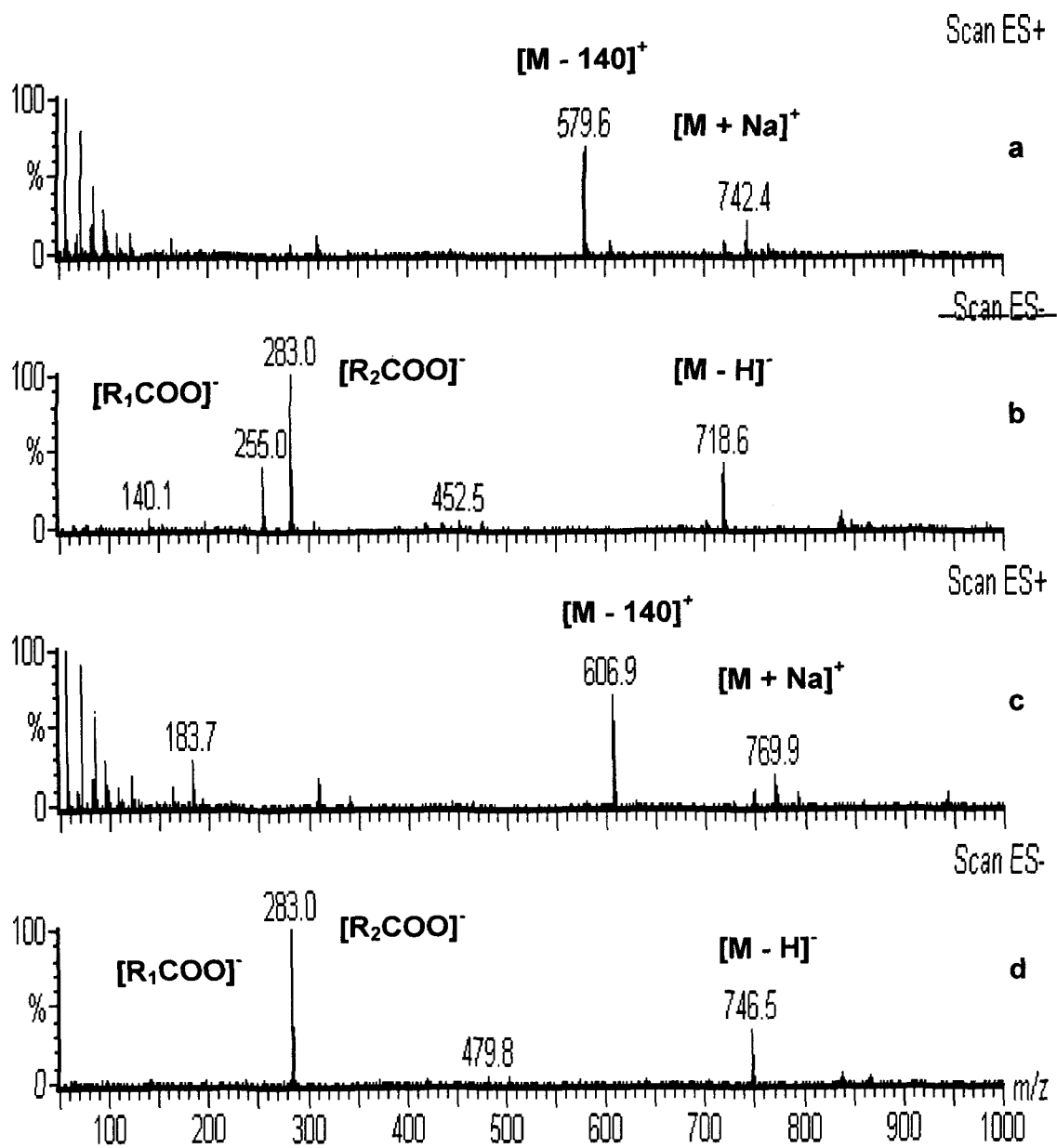
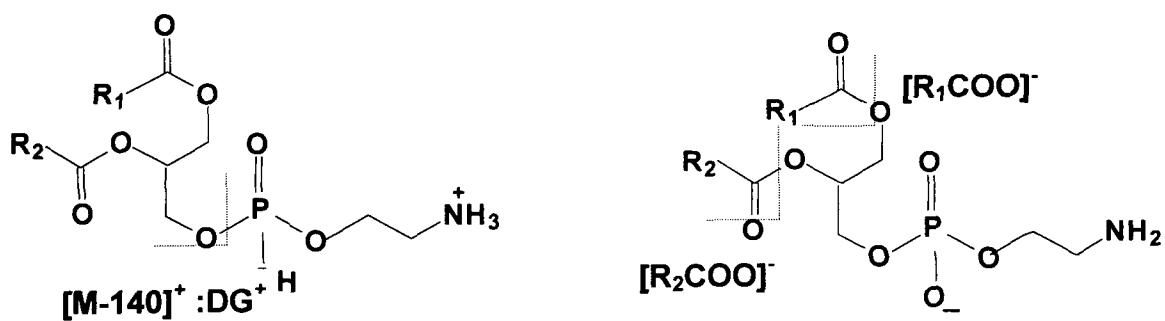
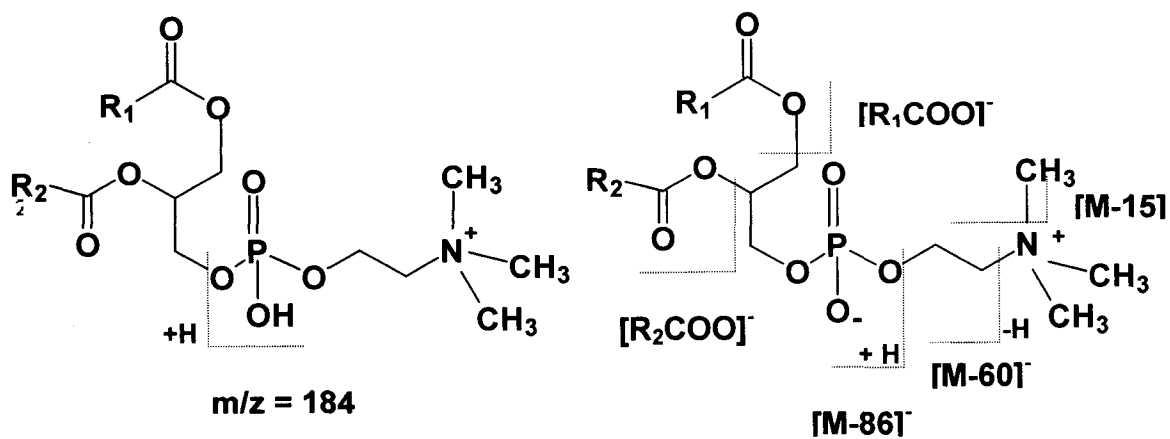
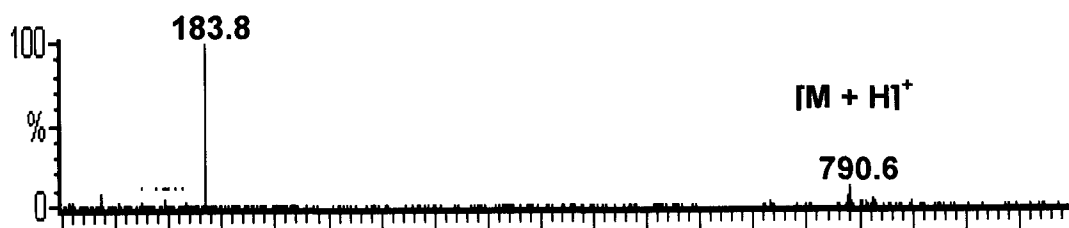


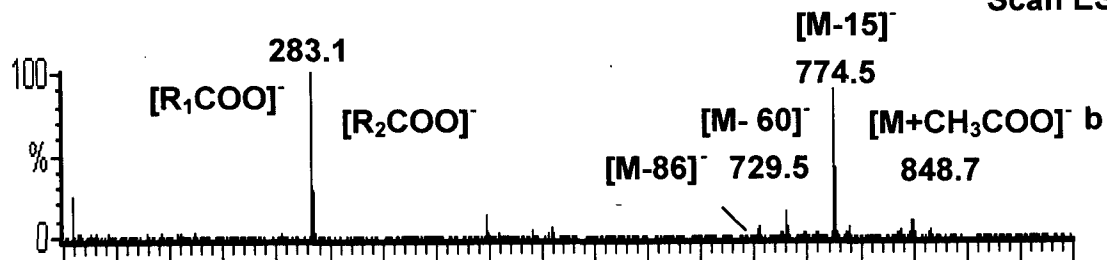
Figure 6. Mass spectra of (a),(b) 16:0, 18:0 - PE, (c),(d) 18:0, 18:0 - PE



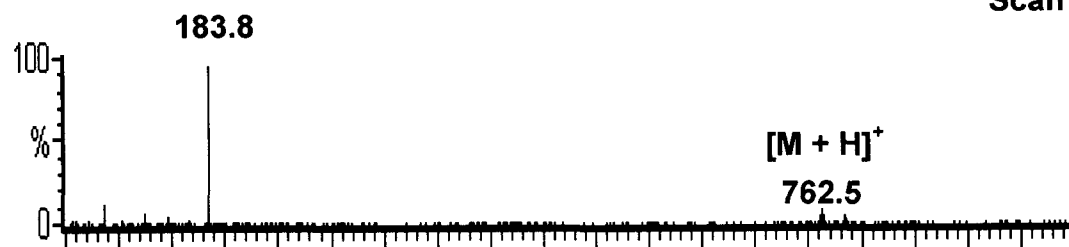
Scan ES+



Scan ES-



Scan ES+



Scan ES-

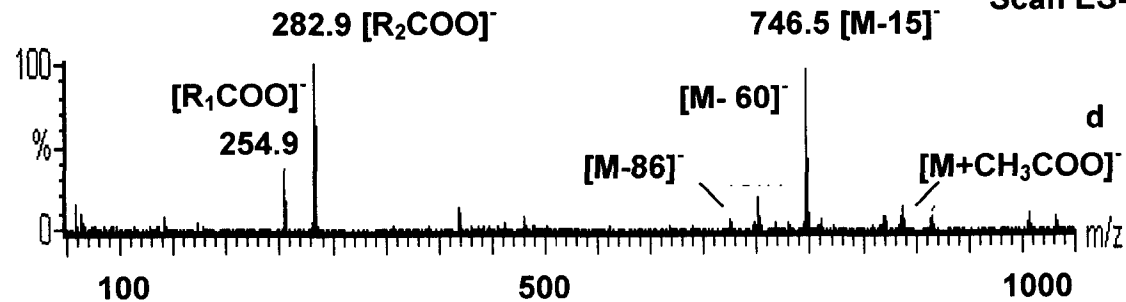


Figure 7. Mass spectra of (a),(b) 18:0,18:0 – PC, (c),(d) 16:0, 18:0 - PC

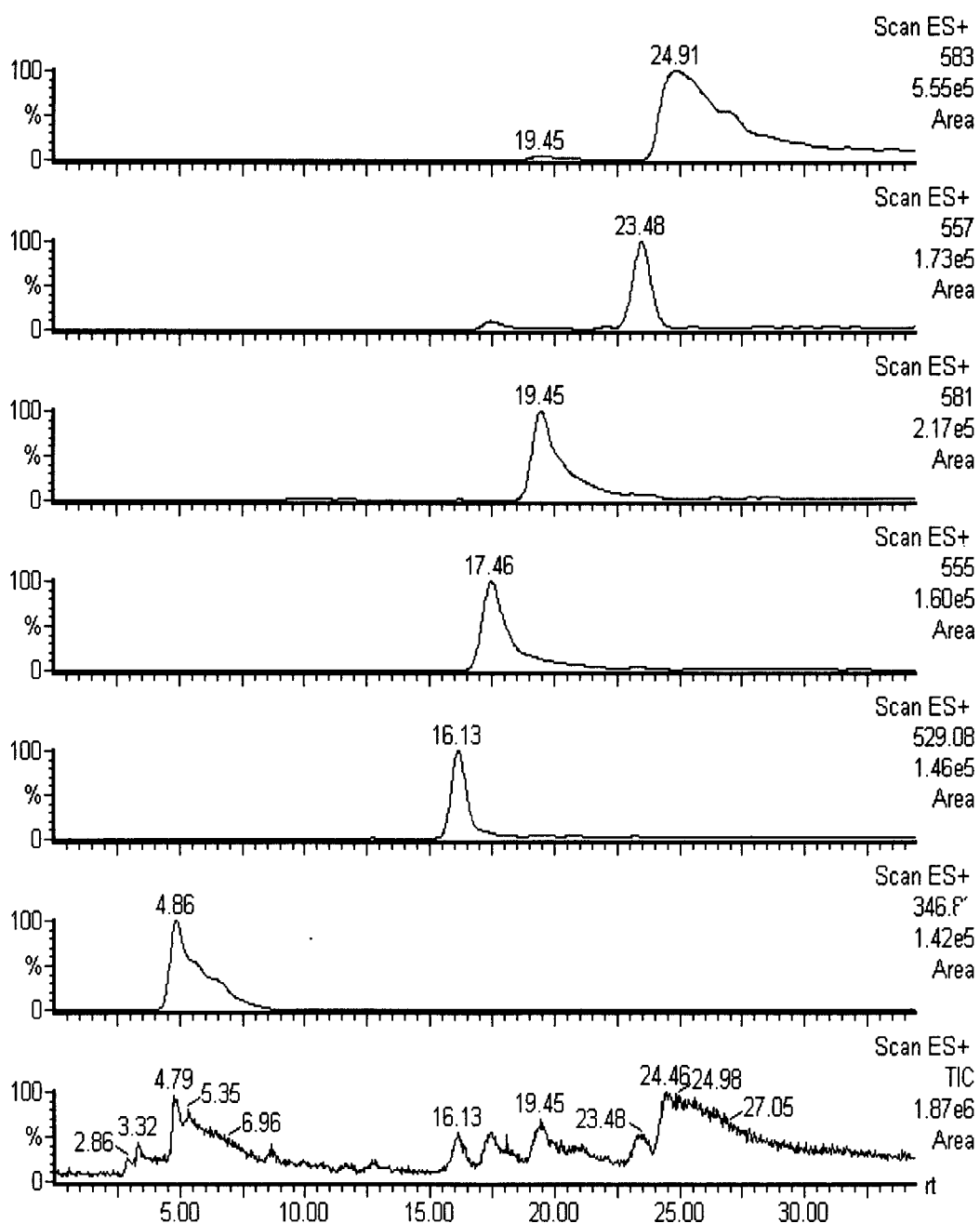


Figure 8. Positive ion chromatograms obtained from ceramide IIIB (DS - ceramide Y30) by selectively monitoring molecular ions(CV=60V)

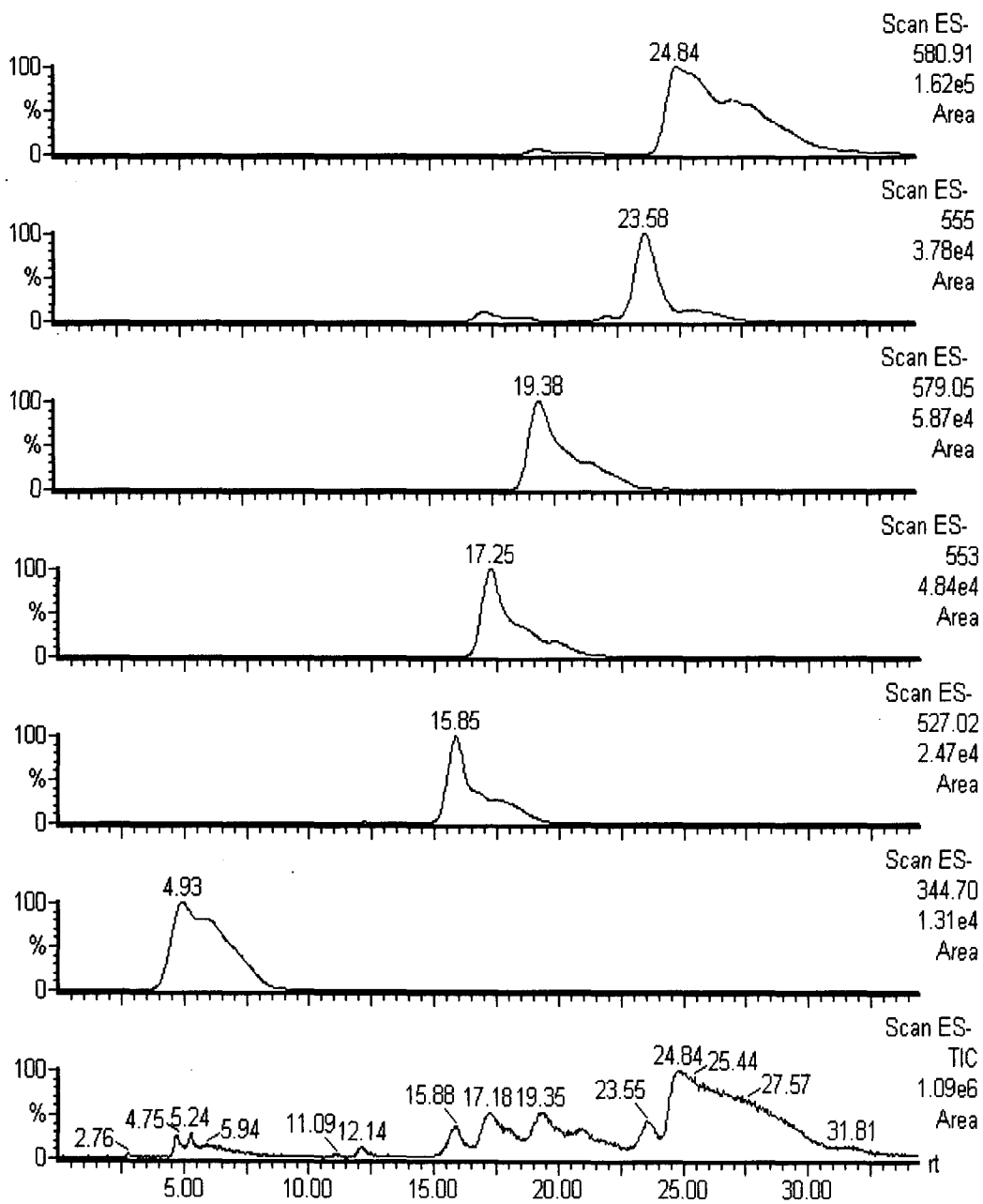


Figure 9. Negative ion chromatograms obtained from ceramide IIIB (DS-ceramide Y30) by selectively monitoring molecular ions (CV=80V).

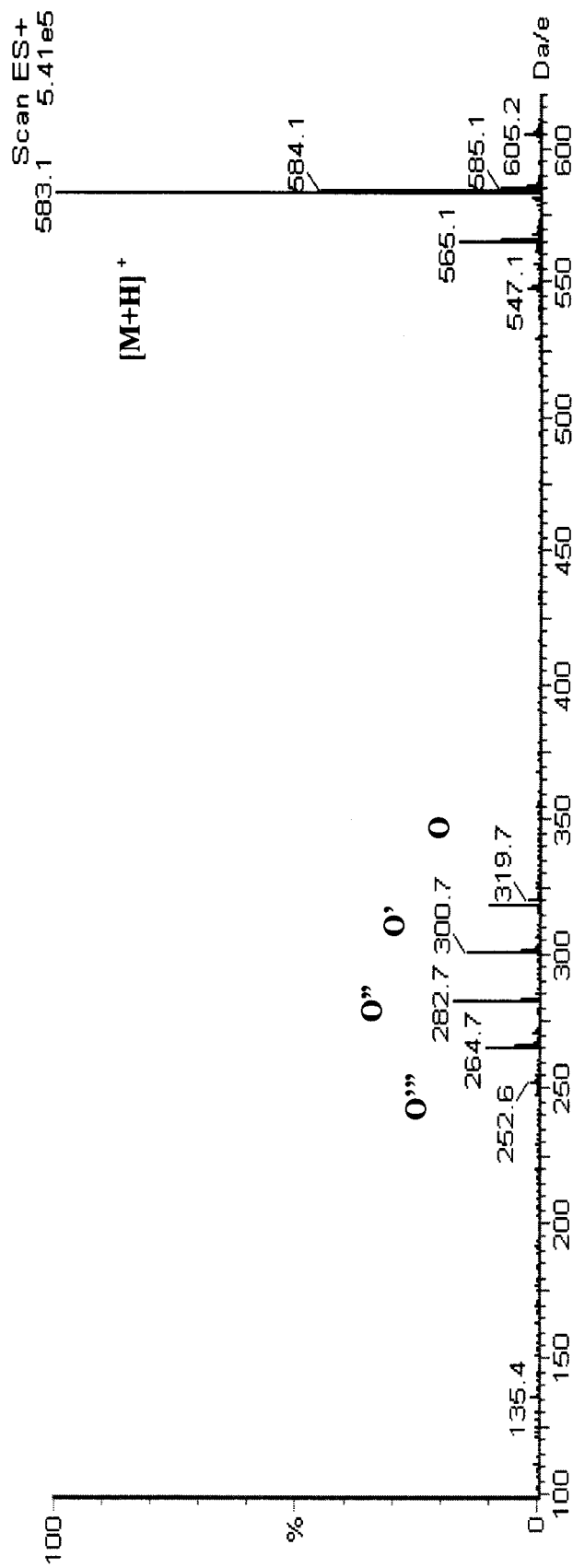
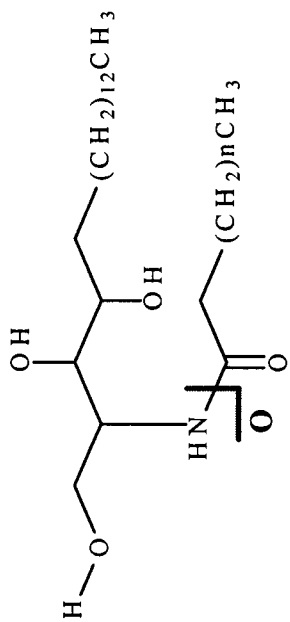


Figure 10. Mass spectra of ceramide III B in DS -ceramide Y 30 sample (CV = 60 in positive ion mode)