

지방산의 p-BPB 유도체에 의한 비누 생분해도 분석 방법

오세웅 · 이자경^{†*} · 정 용* · 장석윤 · 김여경

*연세대학교 환경공해 연구소

럭키 생활용품 · 화장품 연구소

(1992. 12. 11. 접수)

An analytical method of soap biodegradability with fatty acid p-BPB derivatives

Se-Woong Oh, Ja-Kyoung Lee^{†*}, Yong Chung*, Sug-Youn Chang, Yeo-Kyung Kim

**The Institute for Environmental Research, Yonsei University, College of*

Medicine, C. P. O. box 8044, Seoul 120-752, Korea

Lucky Research and Development Institute for Household Products-Cosmetics,

150, Song Jong-Dong, Cheong-Ju, Korea

(Received Dec. 11, 1992)

요약 : 최근 합성계면활성제의 사용 증가에 따른 수질오염의 우려로 인하여 천연 유지비누의 사용이 증가되고 있는 실정이다. 그러나 하천의 자정용량을 초과하는 오염물질의 유입이 수질 오염을 유발하는 원인이 되므로 과도한 사용량의 증가 역시 환경에 부하를 준다. 현재까지 비누 지방산의 생분해 측정방법이 공정화되어 있지 않아 비누에 의한 수질오염도를 파악하기 어려웠다. 따라서 본 연구에서 새로이 측정방법을 고안하였고 환경 중 비누의 생분해도를 측정, 평가하였다. 본 연구의 내용 및 결과는 다음과 같다. 비누 중의 지방산염들은 비극성, 비양자성 용매하에서 crown ether를 촉매로 하여 p-BPB(p-bromophenacyl bromide)와 고체-액체 상전이 반응으로 유도체화시켰고 역상 고성능 액체크로마토그래피에 의해서 분리시켰다. 검출한계는 탄소사슬 길이에 따라 대략 10~50ng이었고, EDTA 첨가에 의한 유도체화 반응은 칼슘염 뿐만 아니라 다른 금속염에도 적용시킬 수 있었다. Yeast extract 존재 유무에 따라 지방산 유도체화 반응의 회수율은 각각 95.4 ± 1.2 , $85.2 \pm 2.4\%$ 였다. 본 분석법은 진탕배양법과 같은 인위적인 조건 뿐만 아니라 자연계에 존재하는 지방산염의 생분해도 측정에 적용하였다.

ABSTRACT : Fatty acid salts derived from soap can be transferred into a typical derivative with p-bromophenacyl bromide using crown ether, a catalizer by the solid-liquid phase transfer reaction in nonpolar, aprotic solvents and separated by the reverse phase high performance liquid Chromatography (RP-HPLC) and determined using UV detector. The minimal limit of detection was defined at approximately 10~50ng in accordance with the chain length. The derivatization reaction in the presence of EDTA can be applied not only to the calcium salts but also to the other various metal salts. The recoveries of fatty acid derivatizations in the absence and presence of the medium containing the yeast extract

were obtained 95.4 ± 1.2 , and $85.2 \pm 2.4\%$ respectively. The analytical method would be applicable to determine the biodegradation of fatty acid salts in nature as well as in artificial condition such as shaker flask-medium method.

Key Words : Fatty acid, p-BPB derivatives, Biodegradability

1. 서론

환경의 자정능력을 초과하는 오염물의 유입은 결국 환경오염을 유발하는 원인이 되는데, 최근 합성세제의 과다 사용에 따른 하천의 수질오염 우려를 방지하기 위해 제안되고 있는 유지비누 역시 사용량이 급격히 증가하게 되면 환경에 과도한 부담을 줄 수 있다. 특히 지방산의 경우 환경 중 미량 성분들과 결합하여 오히려 분해가 느려지는 것으로 알려져 있다. 따라서 자연 중의 지방산 잔류농도를 정확하고 간편하게 측정, 분석할 수 있는 방법이 공경화될 필요가 있다.

현재까지 연구된 지방산 분석방법들을 간략히 살펴보면 다음과 같다. 지방산 측정 방법으로는 분광광도법, 기체 크로마토그래피, 그리고 고성능 액체 크로마토그래피를 이용해서 분석하고 있으며 측정할 수 있는 양은 선택된 측정 방법에 따라 큰 차이가 있다. 분광광도법의 경우 phenol red를 이용해서 1mg 미만의 식물성 오일 중의 지방산을 정량할 수 있는 방법이 최근에 발표되었다. 시료 중 불안정한 성분들이 혼합되어 있는 경우에는 매우 적절한 방법으로 선택되지만 지방산 탄소 분포별로 정량 분석할 경우 제약을 받게 된다. 기체 크로마토그래피^{2~6}의 경우 휘발성이 용이한 지방산 methyl ester로 유도체화시킨 후 분리 측정하고 있다. 이들 방법은 지방산 중에 지방산 유도체(특히 지방족 아미계통)들이 혼합되어 있을 경우, 지방산 유도체들에 의해 지방산 분리에 방해받을 뿐만 아니라, 수 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 정도의 미량 분석을 하는 데 어려운 점이 많다. 7,8 고성능 액체 크로마토그래피의 경우 지방산과 같이 자외선이나 가시광선에 대해서 비흡수 화합물(UV-nonabsorbing compound) 또는 비형광성 화합물(nonfluorescent compound)에는 UV 검출기와 형광 검출기를 사용할 수 없다.⁹ 검출기들의 이러한 단점을 보완하고자 많은 연구가 이루어지고 있는데, 형광양자효율(fluorescence quantum yield)이 큰 화합물 또는 자외선이나 가시광선 영역에 몰흡광계수(molar absorp-

tivity)가 큰 화합물을 가지고 시료 성분에 유도체화시킨 후 비발색단의 물질을 효과적으로 분리 및 검출할 수 있도록 널리 응용화되어지고 있다. Dünge¹⁰ 등은 지방산 및 유기산 등에 형광성 물질로서 4-bromomethyl-7-methoxy coumarin을 도입하였고, S. Lam¹¹ 등에 의해서 고성능 액체 크로마토그래피로 수 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 분리, 검출하였다. 이를 이용하여 Hagashi¹² 등은 지방산 탄소 사슬 길이에 따라 1~50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 분리 검출하였고, 강물 중의 지방산 생분해도 측정에 적용시킴으로써 연구 영역을 확장시켰다.

UV 검출기는 몰흡광계수가 큰 발색단을 갖고 있는 화학종들에 대해서는 극미량까지 검출할 수 있다는 점 때문에 자외선에 대해서 비흡수 화학종들의 극미량을 측정하기 위해서는 몰흡광계수가 큰 화학종으로의 유도체화가 요구된다. 예를 들면 Fitzpatrick¹³ 등은 hydroxysteroid를 자외선에 흡수할 수 있는 화합물로 만들기 위하여 benzoyl chloride로 유도체화시켜 분리 정량하였다. Henry¹⁴ 등은 steroid들을 2,4-dinitrophenyl hydrazine으로 유도체화시켜 10ng까지 정량하였다. Dingman¹⁵ 등은 11-hydroxy-17-keto steroid들을 2,4-dinitrophenyl hydrazine 유도체들을 사용하여 역상 액체 크로마토그래피로 분리 정량하였다. Procaro¹⁶ 등은 p-methoxy-benzoate 유도체를 사용하여 hexachlorophene를 ng 수준까지 분리 정량하는 데 성공하였다. 특히 지방산 유도체화에 대한 연구는 몇몇 연구자들에 의해서 이루어지고 있는데, Politzer¹⁷는 자외선 흡수 화학종으로서 1-benzyl-3-p-tolutriazine을 사용하였고 Cooper¹⁸ 등은 UV 검출기를 사용하기에 적당한 2-naphthacyl bromide를 이용하여 지방산 유도체를 만든 후 고성능 액체 크로마토그래피로 분리하여 4~90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 측정하였다. Drust¹⁹ 등은 crown ether^{20~22}들이 비양자성 용매(aprotic solvent) 하에서 칼륨이온과 강력한 착물을 형성함으로써 염들을 녹일 수 있다는 Pedersen²³의 연구 결과를 이용해서 지방산 칼륨염을 비극성 또는 비양자성 용매에 녹인 후

p-BPB(p-bromophenacyl bromide)와 SN_2 반응을 시켜 p-BPB 지방산 유도체를 합성하였고 UV 검출기를 사용한 고성능 액체 크로마토그래피로 지방산 탄소 길이에 따라 1~50ng까지 정량하였다. 그리고 반응 용매 조건, 촉매 종류에 따른 생성물의 수율, 지방산-p-BPB 유도체의 분광학적인 특성 및 액체 크로마토그래피 분리조건 등 다각적인 연구를 수행하였다. 그런데 자연계에 존재하는 지방산은 각종 금속염(metal salt)으로 이루어져 있고 특히 하천 중에는 칼슘이온들이 상당량 존재하기 때문에 지방산은 물에 불용성인 칼슘염으로 형성되어 있다.²⁴ 이러한 하천 중에 미량 존재하는 지방산을 정량하기 위해서는 다른 여러 가지 금속 이온으로 이루어진 지방산염을 crown ether를 촉매로 한 지방산-p-BPB 유도체화 반응에서의 그의 생성물과 액체 크로마토그래피에 의한 최적의 분리 조건이 요구된다. 본 실험에서는 하천 중에 존재하는 지방산염들을 분리 정량하기 위한 일환으로써 칼슘(Ca^{+2}), 칼륨(K^+) 등 여러 지방산 금속염들을 crown ether를 촉매로 한 p-BPB 유도체 반응에 대한 제반 실험 방법들을 검토 조사하였으며, 실제로 지방산을 진탕배양법에 의한 성분해도 측정 방법에 적용 가능한지를 연구하였다.

2. 실험

2. 1. 측정 기기 및 실험 기구

본 연구에서 지방산-p-BPB 유도체의 분리 및 정량에 사용한 HPLC는 Hewlett packard사의 Model HP1050 Series Quaternary Pump로서 Rheodyne Injector, Model HP1050 Series UV/vis 검출기 및 HP 3396A Integrator가 부착된 것이다. 분리관으로는 Hewlett Packard사의 Hypersil ODS(4.6mm I. D. × 200mm Particle Size 5 μ m)를 사용하였다. 이동상과 분리관의 온도를 일정하게 유지하고, 조절하기 위하여 Waters사의 Model Column Heater Module 컬럼 오븐을 장착하였다. 지방산을 칼륨염으로 재결정시키기 위하여 Bücher(스위스)사의 진공회전 증발기 또는 오븐을 사용하였다. 한편, HPLC급의 순수 제조는 Millipore사의 Milli-Q Reagent Water Purification System을 이용하였고, 용리액은 Millipore Membrane Filter(Type FH, Pore Size 0.5 μ m)로 정제하였으며,

시료 주입에 사용한 syringe는 Hamilton Co. 50 μ l Micro Syringe를 사용하였다.

2. 2. 시약

표준물질로 사용한 지방산은 독일 Henkel사의 Caprylic acid(C_8), Capric acid(C_{10}), Lauric acid(C_{12}), Myristic acid(C_{14}), Palmitic acid (C_{16}), Stearic acid (C_{18}), Arachidic acid(C_{20}), 그리고 일본 Gasukuro Kogyo 사의 Oleic acid($C_{18:1}$), Linoleic acid($C_{18:2}$)를 사용하였다. 유도체 시약인 p-bromophenacyl bromide는 일본 Tokyo Kasei Chemicals 제품, 그리고 촉매인 18-crown-6-ether는 미국 Sigma 제품 특급 시약으로 정제하지 않고 그대로 사용하였다. K_2CO_3 , $CaCl_2$, $MgCl_2$, $NaCl$, $FeCl_2$, ethylene diamine tetracetic acid tripotassium salt(EDTA-3K)는 일본 Wako사 제품의 특급 시약을 사용하였다. 그밖에 용리액 및 반응 용매로 사용한 benzene, 2-propanol, acetone, methanol, acetonitrile 등과 같은 시약은 Merck사 제품 HPLC용 시약으로서 Millipore Membrane Filter(Type FH, Pore Size 0.5 μ m)로 정제하여 사용하였다. 한편, 진탕배양액에 첨가된 각종 염들인 NH_4Cl , K_2HPO_4 , KCl , $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 는 일본 Shinyo Pure Chemicals 제품, 그리고 yeast extract는 미국 Difco Laboratories사 제품을 사용하였다.

2. 3. 실험 방법

2. 3. 1. 지방산 유도체화 반응 원리

지방산 유도체화 반응은 비양자성(aprotic solvent)하에서 친핵성(nucleophile)을 가지고 있는 지방산 칼륨염의 카르복실레이트 음이온(carboxylate anion)이 p-BPB의 acylbromide와 SN_2 반응을 하게 된다. 이 단계에서 acetonitrile, acetone과 같은 비양자성 용매에 p-BPB와는 다르게 지방산 칼륨염은 용해되지 않으므로 촉매로써 crown ether를 첨가하게 되면 지방산 칼륨염이 용해되어 p-BPB와 강력한 SN_2 반응을 하게 된다. 이러한 반응을 고체-액체 상전이 반응(solid-liquid phase transfer reaction)이라 하며, 칼륨이온이 crown ether와 착물을 잘 형성하므로²⁰ 지방산을 칼륨염으로 만들었다. 이와 같은 반응에 관련되는 메카니즘은 다음과 같다.¹⁹

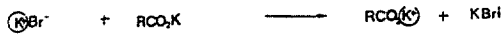
ANALYTICAL METHOD

I. Fatty Acid derivatization

<step I>



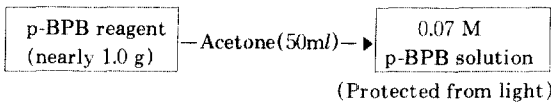
<step II>



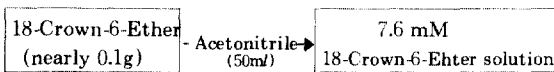
<step II>

II. Preparation of stock solutions

1. Alkylating Agent



2. Catalyst



2. 3. 2. 표준용액 제조

p-BPB 모액은 acetone에 녹여 $6.8 \times 10^{-3}M$, 그리고 상전이 촉매인 18-crown-6-ether는 acetonitrile에 녹여 $1.6 \times 10^{-3}M$ 되도록 조제하였다. 표준물질인 Caprylic acid(C₈), Capric acid(C₁₀), Lauric acid(C₁₂), Myristic acid(C₁₄), Palmitic acid(C₁₆), Stearic acid(C₁₈), Oleic acid(C_{18:1}), Linoleic(C_{18:2}) acid와 내부 표준 물질인 Arachidic acid(C₂₀)를 각각 0.01g씩 취한 후 250ml methanol 용액으로 조제하였고, 모든 시료는 냉장고에서 $-5^{\circ}C$ 이하로 보관하였다. 특히 p-BPB 용액은 알루미늄 호일로 싸서 빛을 차단시켰다.

2. 3. 3. 시료 유도체화 반응

생분해시킨 시료 3ml를 10ml의 등근 플라스크에 취하고(본 실험에서는 $30\mu g/ml$ 시료를 3.4×10^{-7} mole 되게 시료를 취하여 반응시켰고 생분해시킨 다음 $-70^{\circ}C$ 에서 냉동, 보관하였다) 용매는 진공회전 증발기 또는 오븐으로 제거하였다. 0.01g EDTA, 0.02g K₂CO₃ 및 10ml methanol을 첨가한 후 10분 동안 강하게 저어 주어 용해시켰다. Methanol을 진공회전 증발기로 제거하고 18-

crown-6-ether 용액 6ml와 p-BPB 용액 0.2ml를 첨가한 다음 $83^{\circ}C$ 에서 30분 동안 반응시켰다.

2. 3. 4. 표준 물질의 지방산 유도체화 반응

'KS M2714 합성세제 생분해 실험 방법'에 의거하여 합성세제 시료를 제외시키고 만든 yeast extract를 포함한 무기영양배지를 6 개의 10ml 등근 플라스크에 3ml씩 취한 후 진공회전 증발기 또는 오븐으로 수분을 제거한 다음, 탄소 분포에 따른 지방산 표준용액을 각각 0.2, 0.6, 1, 3, 5ml, 그리고 내부 표준용액을 0.5ml씩 취하였다. 모든 반응시료에 0.02g K₂CO₃와 0.01g EDTA를 넣어 준 후 10분 동안 강력히 저어 주어 용해시켰다. 용매는 진공회전 증발기로 제거시켜 지방산염 결정체를 얻었다. 표준용액 지방산 mole 수에 따라 2~3배가 되게 p-BPB 용액을 0.2, 0.3, 0.5ml씩 첨가한 후 18-crown-6-ether 용액을 6ml씩 넣고 $83^{\circ}C$ 에서 30분 동안 반응시켰다.

2. 3. 5. 분리 조건

지방산 유도체를 측정하기 위한 HPLC/UV 분석 조건은 Table 1과 같다.

Table 1. HPLC Conditions

Detector	UV at 254 nm			
Column	Hypersil ODS (4.6mm I.D. × 200mm L.)			
Mobile phase	Gradient system			
	A> H ₂ O : CH ₃ CN = 10: 90			
	B> H ₂ O : CH ₃ CN = 50: 50			
	C> CH ₃ CN = 100			
Time	Flow rate	A	B	C
Initial	1.5	25	75	0
20 min.	1.5	100	0	0
33 min.	1.5	100	0	0
38 min.	1.5	0	0	100
60 min.	1.5	25	75	0

2. 3. 6. 비누 생분해 실험

'KS M2714 합성세제 생분해 실험 방법'에 규정된 진탕배양법을 이용하였으며, 실험시료(비누소지 및 비누제품)는 활성(active) 농도로 30mg/L가 되도록 첨가하고, 활성오니는 중량하수처리장의 활성오니를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

지방산 p-BPB 유도체의 최대 흡수 파장을 측정하기 위하여 본 실험에서는 지방산 유도체가 HPLC에서 분리되어 자외-가시선 검출기로 흘러 들어갈 때 HPLC의 pump를 정지시켜 시료를 검출기에 trap시킨 후 지방산 유도체를 각 탄소 분포별로 300~200nm까지 자외선 스펙트럼을 측정하여 본 결과 그에 대한 대표적인 스펙트럼은 Fig. 1 과 같다. 지방산 유도체를 용해시킨 용매에 따라 흡수 스펙트럼 봉우리가 단파장 또는 장파장으로 이동하지만¹⁹, 본 실험의 HPLC에서 흘러준 용매 조건하에서는 최대 흡수 파장이 254nm로 측정되었고, 탄소 분포에 따라서 흡수세기 및 최대 흡수 파장에는 영향을 주지 않았다. Fig. 2는 Hypersil ODS(200mm×4.6mm, 5 μ m) 컬럼을 사용하였고 이동상으로는 90% acetonitrile 수용액(A)와 50% acetonitrile 수용액(B)을 A:B=25:75~100:0 기울기 용리(gradient elution)로 흘러 주어 지방산-p-BPB 유도체를 분리한 전형적인 HPLC 크로마토그램을 보여 준다. 분리조건은 비누의 주성분으로서 특성을 갖고 있는 C₈~C₁₈ 지방산을 동시에 분리할 수 있는 조건에 초점을 맞추었으며, 보다 탄소 사슬이 짧은 지방산을 분석하고자 할 경우 본 분석 조건 중 이동상 혼합 비율을

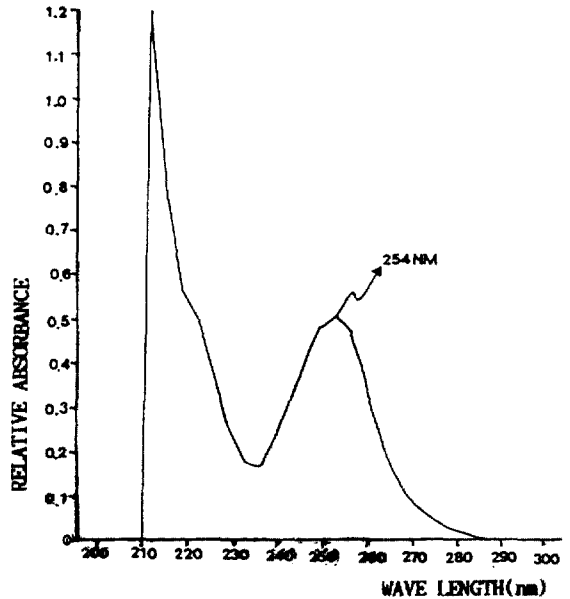


Fig. 1. Absorption Spectra of Fatty Acid p-BPB derivatives. (8 μ l cell, 90% CH₃CN / 10% H₂O sample)

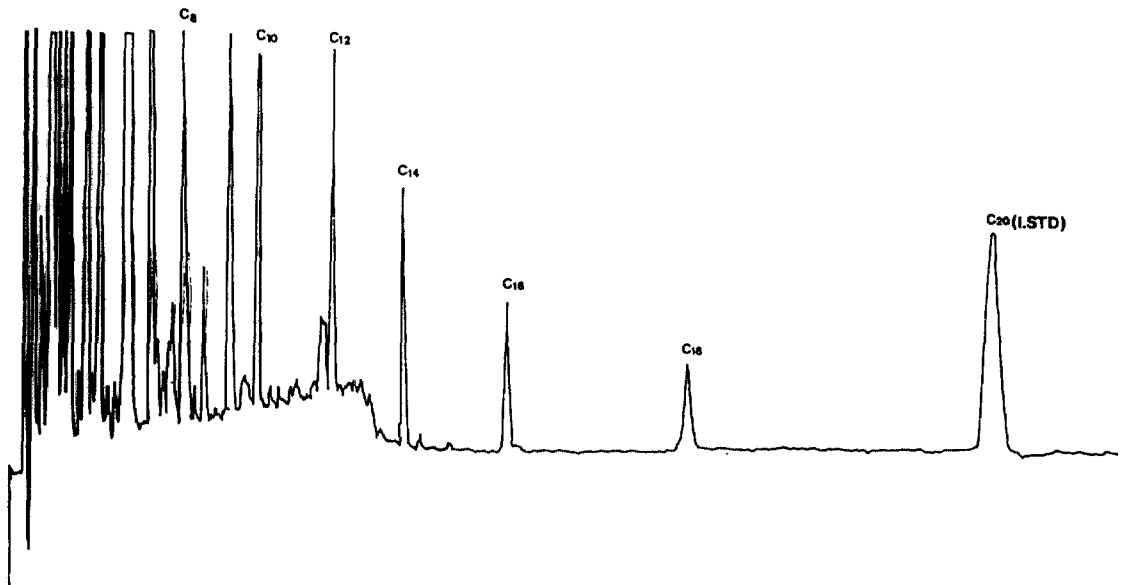


Fig. 2. Chromatogram of Fatty acid p-BPB Derivatives.

Column : 200mm L. × 4.6mm I. D., Hypersil ODS. Mobile Phase : 10% water in acetonitrile(A) / 50% water in acetonitrile(B) [A:B=25:75~100:0 gradient system]. Flow Rate : 1.5ml/min., Column Temp. : room temp., UV detector : 254 nm., Sample injection : 30 μ l.

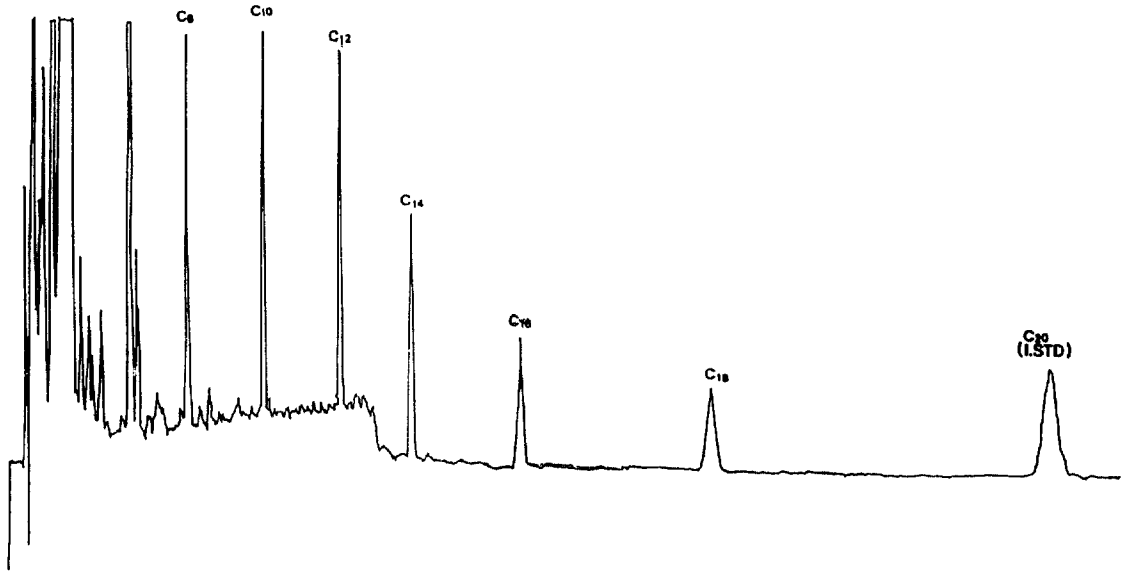


Fig. 3. Chromatogram of Fatty acid p-BPB Derivatives reacted in Yeast Extract (160 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Column : 200mm L. \times 4.6mm I. D., Hypersil ODS. Mobile Phase : 10% water in acetonitrile(A) / 50% water in acetonitrile(B) [A:B=25:75~100:0 gradient system]. Flow Rate : 1.5 ml/min., Column Temp. : room temp., UV detector : 254 nm., Sample injection : 30 μl .

일부 변경시키면 가능하다. 지방산 형광 유도체에 의한 HPLC 형광 검출기 분석¹²은 이동상의 물의 함량에 따라 그들의 양자효율(quantum yield)이 변하므로 분석 조건 중 기울기 용리 분석은 정량성을 상실하는 반면에 지방산 유도체의 HPLC/자외선 검출기 분석은 이동상을 다양하게 변화시키는 기울기 용리 분석을 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ yeast extract를 포함한 비누소지를 앞서 설명한 바와 같은 조건으로 유도체화 반응 후 분리하여 얻은 크로마토그램을 Fig. 3에 나타내었다. 시료 중의 yeast extract의 존재 유무에 따라서 본 실험의 HPLC 분리 조건이 영향을 받지 않았으며, yeast extract 농도에 따른 지방산 유도체화 반응에 대한 영향은 Fig. 4에 나타내었다. 지방산 표준물질들 C_8 :0.48, C_{10} :0.42, C_{12} :0.48, C_{14} :0.50, C_{16} :0.42, C_{18} :0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 고정시키고 yeast extract의 농도를 $0 \sim 10.5 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 변화시켜 가며 지방산 유도체화 생성물을 봉우리 넓이로 상대비교하였다. Yeast extract의 농도가 $6 \times 10^2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이상에서는 지방산과 뭉쳐서 sludge 형태로 존재하기 때문에 acetonitrile하에서의 유도체화 반응을 yeast extract가 방해하는 것으로 생각된다. 본 실험에서는 이

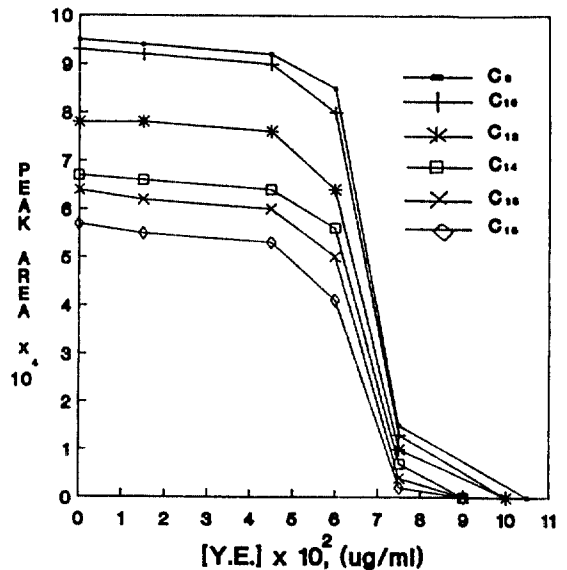


Fig. 4. Effect of Yeast extract on the Derivatization of Fatty Acids with p-BPB.

C_8 :0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C_{10} :0.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C_{12} :0.48 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C_{14} :0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C_{16} :0.42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, C_{18} :0.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. [Y.E.] means concentration of yeast extract.

와 같은 점을 고려하여 시료 중 yeast extract의 농도가 $6 \times 10^2 \mu\text{g/ml}$ 이하로 되게 취하여 유도체화시켰다. 진탕배양에 의한 성분해도 실험에서 지방산이 각종 금속이온(주로 Ca^{2+} , Mg^{2+})과 결합하여 물에 불용성인 지방산 금속염을 형성하여 배양용기 기벽에 작은 알갱이 형태로 흡착되기 때문에 본 실험에서는 0.01g EDTA-3K를 첨가한 후 잘 흔들어 불용성 지방산 금속염들을 녹인 다음 시료를 채취하였다. 비록 EDTA-3K는 4개의 카르복실기를 가지고 있지만 지방산 유도체화 반응에서 EDTA-3K 분자내의 입체적인 방해¹²(steric hindrance)에 기인하여 EDTA-3K의 카르복실기와

p-BPB는 서로 반응을 하지 않는 것으로 알려져 있다. 지방산 유도체화 반응에서 각종 금속이온들의 존재 유무에 따른 영향을 Table 2에 수록하였다. Myristic acid 유도체의 봉우리 넓이에 대해서 Lauric, Palmitic acid 유도체의 봉우리 넓이비로 각종 금속이온에 따른 유도체화 반응성을 조사한 결과 별다른 차이점을 보여 주지 않았다. EDTA 이온은 알칼리 금속을 제외한 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} 금속 이온과 1:1로 반응하여 안정한 착물을 형성함으로써 불용성 지방산 금속염 형성을 억제하고, 지방산 칼륨염이 형성되기 때문에 crown ether를 촉매로 한 고체-액체 상전이 반응에 의해 지방산이 유도체화되는 것으로 생각된다. 이는 EDTA-3K 존재하에서 미량 지방산 금속염을 정량할 수 있음을 말해 주고 있다. 지방산 유도체화 반응의 반응 용매에 대한 영향을 Table 3에 나타내었다. Benzene, 2-propanol, acetone, methanol, acetonitrile에 대해서 유도체화 반응성을 조사한 결과 특히 acetone과 acetonitrile에서 반응성이 좋았으며, 본 실험에서는 HPLC 이동상과 동일한 acetonitrile을 반응 용매로 선택하였다. Fig. 5와 Fig. 6은 표준물질로 Arachidic acid(C_{20})를 사용하여 yeast extract가 첨가되지 않았을 경우와 0.6mg yeast extract가 첨가되었을 경우 작성한 C_8 - C_{18} 지방산의 검정곡선을 나타내고 있다. 주입량이 $40 \mu\text{l}$ 일 경우 탄소수에 따른 각각의 농도가 평균적으로 $0.2 \sim 20 \mu\text{g/ml}$ 범위에서 양호한 직선성을 보여 주었으며 검출한계는 지방산 사슬 길이에 따라 $10 \sim 50 \text{ng}$ 으로 조사되었다. 성분해 실험조건에 따른 무기영양 배지를 포함한 $2.5 \mu\text{l}$

Table 2. Effect of Various Metal Salts on the Fatty Acid Derivatization Reaction with p-BPB.

Metal Salt	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Area	Ratio ^a
		C_{12}^b	C_{16}^b
None	—	2.62	0.65
CaCl_2	100	2.70	0.66
MgCl_2	100	2.44	0.67
NaCl	100	2.64	0.59
FeCl_2	100	2.42	0.64

- a. The values were obtained by the ratio of the peak area of fatty acid derivatives to that of myristic acid derivative.
 b. Concentrations of C_{12} , C_{14} and C_{16} were 1.94, 0.84 and $0.94 \mu\text{g/ml}$ respectively.

Table 3. Solvent effects on the Derivatization of Fatty Acid with p-BPB.

Solvent	Dielectric constant ^a	Reactivity ^{b,c}				
		C_8	C_{10}	C_{12}	C_{14}	C_{18}
Benzene	2.28	×	×	×	×	×
2-Propanol	18.30	○	○	×	×	×
Acetone	20.77	○	○	○	○	○
Methanol	32.70	△	×	×	×	×
Acetonitrile	37.50	○	○	○	○	○

a. J. A. Dean, "Handbook of Organic Chemistry", McGraw-Hill Co., New York, 1987.

b. Concentrations of fatty acids (C_8 - C_{18}) were $0.5 \mu\text{g/ml}$,

× : no reaction, △ : poor reaction, ○ : good reaction

c. Reaction condition : The solution were heated, with stirring, at 83°C for 30 minutes.

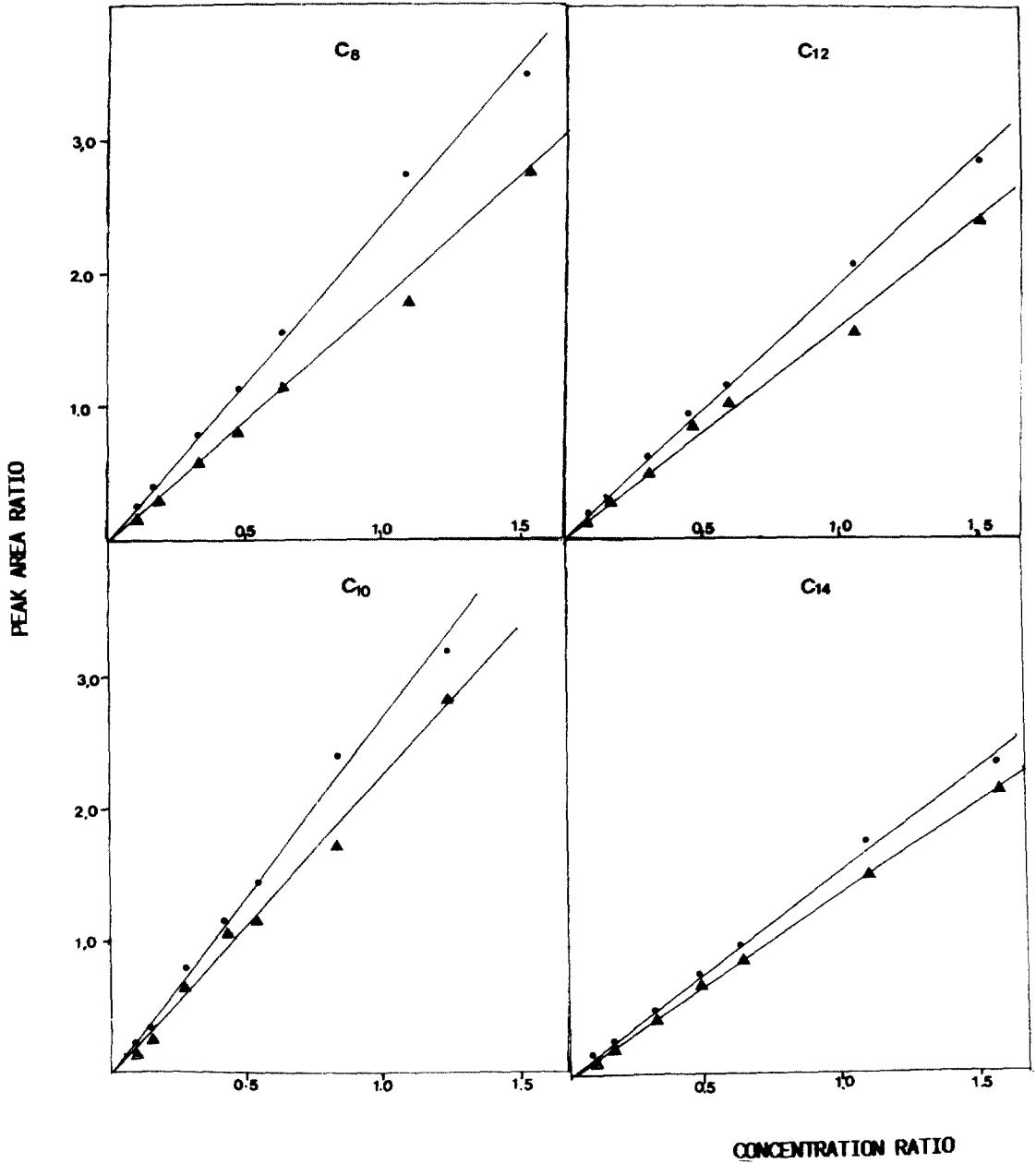


Fig. 5. Plot of Peak Area Ratio of Fatty Acid Derivatives vs. Concentration Ratio of Fatty Acid used in the Derivatization Reaction. Internal Standard was arachidic acid. Peak Area Ratio means Area of Fatty Acid Derivatives to that of Arachidic acid Derivative. Concentration Ratio means concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$) of Fatty Acid to that of arachidic acid used in the Derivatization Reaction.

- Fatty Acid Derivatives
- ▲ Fatty Acid p-BPB Derivatives were reacted under the existence of Yeast Extract.

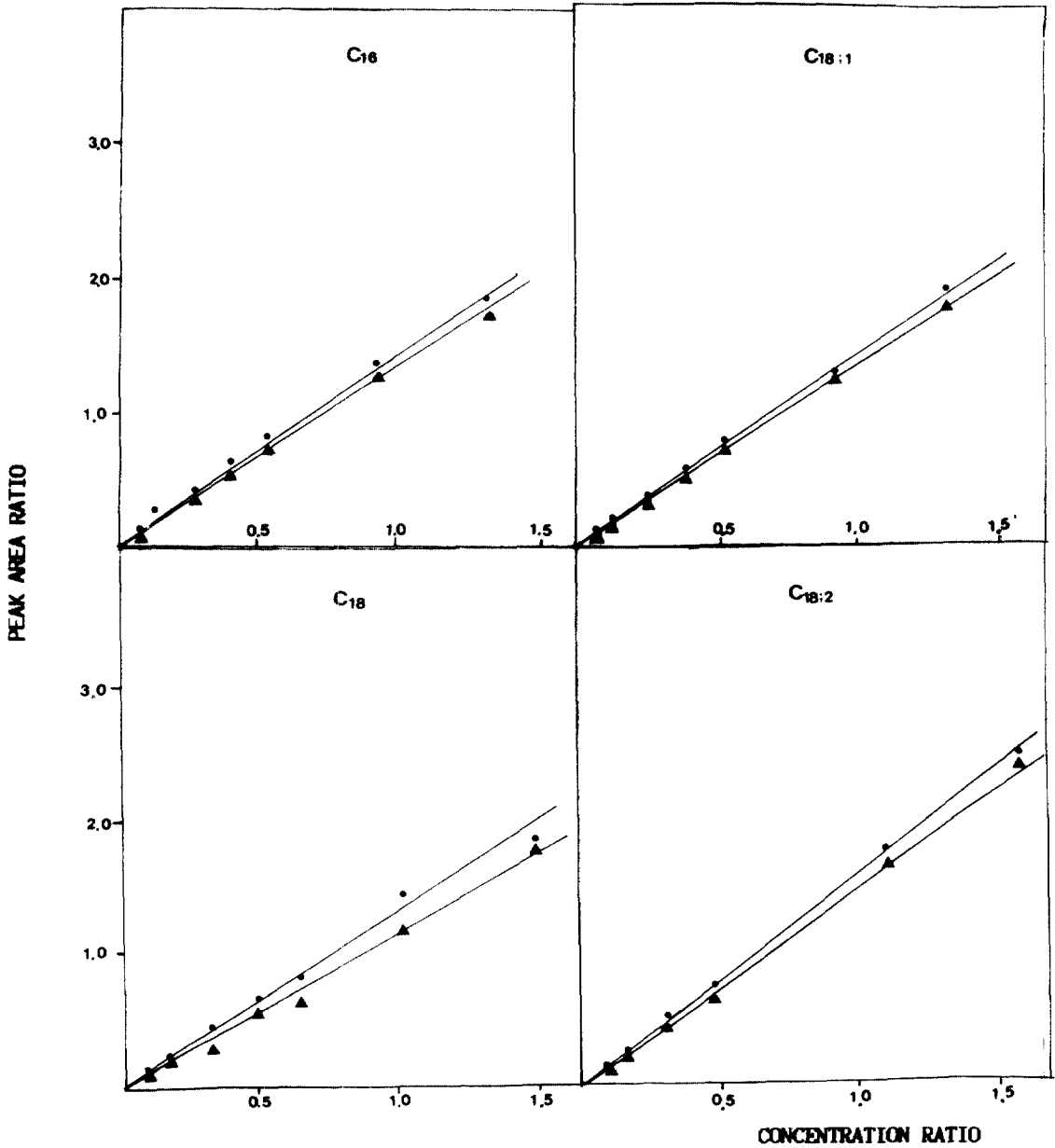


Fig. 6. Plot of peak Area Ratio of Fatty Acid Derivatives vs. Concentration Ratio of Fatty Acid used in the Derivatization Reaction. Internal Standard was arachidic acid. Reaction condition was same as Fig. 5.

● Fatty Acid Derivatives
 ▲ Fatty Acid p-BPB Derivatives were reacted under the existence of Yeast Extract.

g/ml 비누소지 존재하에서 300 μ g/ml yeast extract 를 첨가했을 때와 안 했을 때의 유도체화 반응의 회수율은 각각 85.2 \pm 2.4%와 95.4 \pm 1.2%였다. HPLC에 의

한 지방산의 성분해도 결정은 시간 경과에 따라 지방산 성분별로 잔류 지방산의 감소를 나타내는 봉우리 넓이의 감소를 정량함으로써 성분해도를 측정하였다.

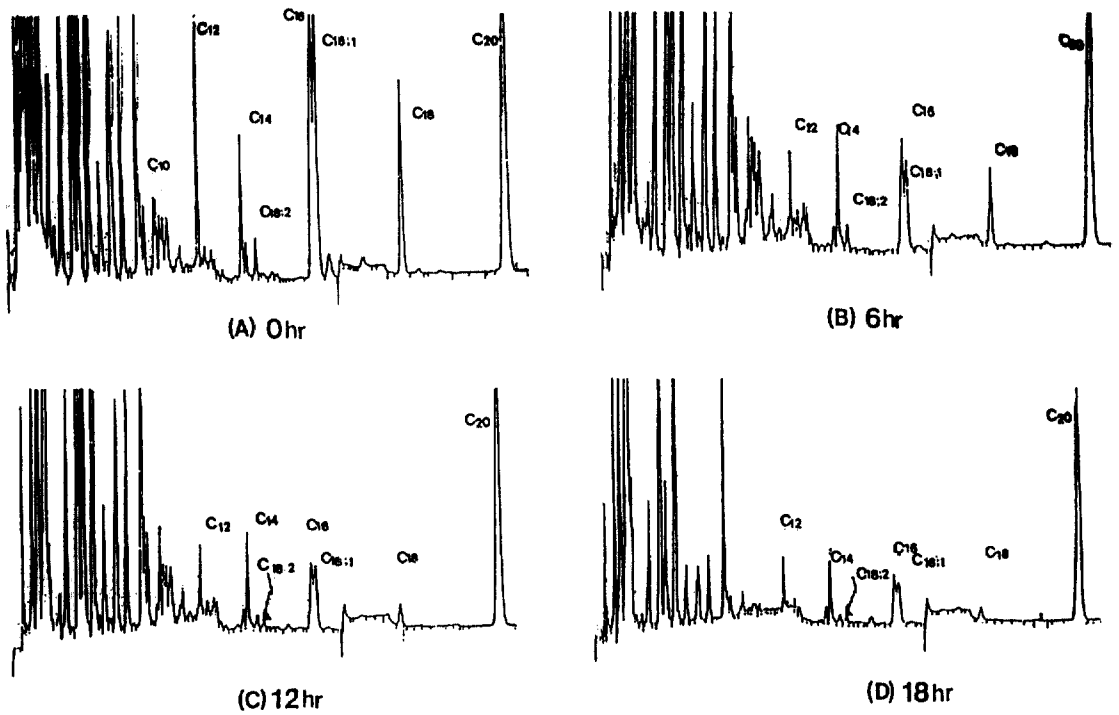


Fig. 7 HPLC Chromatograms of soap-base in course of time. (initial soap-base conc.: 14.2mg/l)
 (A) Initial time (B) After 6 hrs (C) After 12 hrs (D) After 18 hrs

앞에서 기술한 지방산 유도체화 반응을 비누소지(soap-base)에 적용하여 이를 분석한 결과는 Fig. 7과 같이 주로 Lauric(C₁₂), Myristic(C₁₄), Palmitic(C₁₆), Stearic(C₁₈), Oleic (C_{18:1}) acid가 최종적인 생분해 잔류성분으로 남는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 Yoshimura²⁵ 등에 의해 조사되어 알려진 바와 같이 탄소 수에 따른 생분해도 차이 C₁₂ > C₁₀ ≅ C₈ > C₁₄ ≅ C_{18:2} > C_{18:1} > C₁₆ > C₁₈을 잘 나타내고 있다. 따라서 Palmitic(C₁₆), Stearic(C₁₈), Oleic(C_{18:1}) acid 성분이 검출되지 않는 시간이 곧 생분해 완료 시간과 일치하였으며, Fig. 8에서 보는 바와 같이 본 실험에서 만들어진 비누제품의 농도(30 μ g/ml)하에서 15시간 이내에 비누 중 지방산 생분해도는 98% 이상으로 조사되었다.

4. 결론

지방산 유도체 (C₈-C₂₀) 들은 90% acetonitrile과 50% acetonitrile 수용성 용매를 기울기 용리 (gradient elution)로 흘려 주어 200mm L. × 4.6mm i.d., hypersil

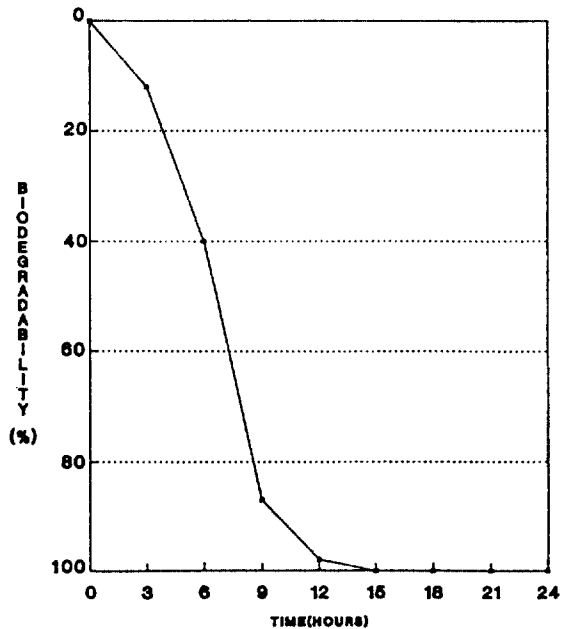


Fig. 8. Biodegradation of soap-base in the shaker flask-medium method.

ODS column을 사용해서 분리할 수 있었다. EDTA 존재하에서 지방산 유도체화반응은 칼슘염 뿐만 아니라 여러 금속염에서 적용되어질 수 있음을 확인하였다. 본 실험의 반응조건에서의 반응 용매는 acetonitrile과 acetone으로 조사되었는데, 이동상과 동일한 acetonitrile을 반응용매로 선택하였다. 이상과 같이 본 실험방법은 시료를 추출, 정제와 같은 복잡한 시료 전처리 없이 EDTA 존재하에서 유도체화시킨 후 미량 지방산을 분리, 정량할 수 있으며, 환경 중에 존재하는 지방산염의 생분해 측정 방법으로서 적용 가능하였다.

인용문헌

1. P. Walde, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**(2), 110-117 (1990).
2. W. Stoffel, F. Chu, and E.H. Ahrens, *Anal. Chem.*, **31**(2), 307-308(1959).
3. L. D. Metcalfe and A.A. Schmitz, *Anal. Chem.*, **33**(3), 363-364(1961).
4. W. A. Pons, Jr. and V.L. Frampton, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **42**, 786-789(1965).
5. H. T. Slover and E.Lanza, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **56**, 933-943(1979).
6. C. D. Bannon, J. D. Craske and A. E. Hilliker, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **62**(10), 1501-1507(1985).
7. G. A. E. Arvidson, *J. Chromatogr.*, **103**, 201 (1975).
8. C. R. Scholfield, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **52** 36 (1975).
9. J. L. Jasperse, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**(11), 1804-1807(1988).
10. W. Düniges and N. Seiler, *J. Chromatogr.*, **14**, 483 (1978).
11. S. Lam and E. Grushka, *J. Chromatogr.*, **158**, 207 (1978).
12. K. Hayashi, J. Kawase, K. Yoshimura, K. Ara, and K. Tsuji, *Anal. Biochem.*, **136**, 314-320(1984).
13. F. A. Fitzpatrick and S. Siggia, *Anal. Chem.*, **45** (14), 2310-2314(1973).
14. R. A. Henry, J. A. Schmit and J. F. Diekman, *J. Chromatogr. Sci.*, **9**, 513(1971).
15. F. A. Fitzpatrick, S. Siggia and J. Dingman, *Anal. Chem.*, **44**(13), 2211-2216(1972).
16. P. J. Procaro and P. Shubiak, *Anal. Chem.*, **44** (11), 1865-1867(1972).
17. I. R. Politzer, G. W. Griffin, B. J. Dowty, and J. L. Laster, *Anal. Lett.*, **6**, 539(1973).
18. M. J. Cooper and M. W. Anders, *Anal. Lett.*, **46** (12), 1849-1852(1974).
19. H. D. Durst, M. Milano, E. J. Kikta, S. A. Connelly, and E. Gruska, *Anal. Chem.*, **47**(11) 1797-1801(1975).
20. J. J. Sam and H. E. Simmons, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **96**(7), 2252-2253(1974).
21. C. L. Liotta and H. P. Harris, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **96**(7), 2250-2252(1974).
22. G. W. Gokel and D. J. Cram, *J. Org. Chem.*, **39** (16), 2445-2446(1974).
23. G. J. Pedersen, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **92**(2), 391-394(1970).
24. Luis Spitz, "Soap Technology For The 1990'S", p.73, *Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, Illinois, U. S.A. (1990)
25. K. Yoshimura, K. Ara, K. Hayashi, J. Kawase, and K. Tsuji, *Jap. J. Limnol.*, **45**(3), 204-212 (1984).