

化粧品 分析에 있어서 Chromatography

(Chromatography in Cosmetic Analysis)

鄭 廣 洙

(太平洋化學(株) 主任技師)

In this article, General principles and applications of column Chromatography for the analysis of cosmetic ingredients are discussed.

Alumina packed column can isolate mineral oils in creams and liquid lanolin, lanolin esters, mineral oils, waxes in Lipsticks.

Also alkyl sulfate in shampoos is fractionated by ion exchange resin column.

I. Chromatography

概 要

로시아의 植物學者 Michael Tswett가 Chromatography를 창안하여 1906년 Chlorophyll을 分離하고 이후 발달되어 지금은 여러 종류의 Chromatography가 있다.

混合物로부터 各成分을 각각 순수하게 分離하여, 얻어진 物質의 純度를 測定하는 일은 化學 研究의 근본적인 問題로서 研究의 成否는 利用하는 수단의 選擇에 크게 左右된다.

Chromatography라는 術語는 그리스어의 色을 의미하는 Chroma와 기록을 의미하는 Graphos에서 유래된 합성어로서, 실험의 結果는 Chromatogram이라고 한다.

Chromatography는 溶質(物質)이 固定相에 吸着 또는 溶解하는것을 移動相에 溶出하여, 連續的으로 조작하여서 物質의 吸着 및 溶解度(分配係數)의 差異에 의하여, 吸着帶 및 溶出 速度가 다른것을 利用한 分別法이다. 移動相은 Gas 혹은 液體로, 固定相은 液體와 固體가 利用된다.

固定相과 移動相을 選擇하는 方法에 따라서 많은 Chromatography가 있고 吸着機構 및 展開法, 또 Column의 型式등에 따라서 각각 명칭이 있으며 뚜렷한 分類는 곤란하다.

展開劑에 의하여

1) Liquid Chromatography

2) Gas Chromatography

操作法에 의하여

1) Column Chromatography

2) Paper Chromatography

3) Thin Layer Chromatography

4) Electrophoresis Chromatography

分離 機構에 의하여

1) Adsorption Chromatography

2) Partition Chromatography

3) Ion-Exchange Chromatography

로 크게 分類할 수 있으며 이들은 다시 세분화되어 分類되고, 分類上 Adsorption Chromatography에 속할 수 있는 Gel-permeation Chromatography, Affinity Chromatography 등이 있다. Chromatography는 分析에 있어서, 試驗 條件의 變化가 無限하기 때문에 대단히 有用하며 Chromatography系의 選擇이 重要하다.

選定된 Chromatography系는

(1) 固定相 移動相과도 安定하고 操作中에 變化가 일어나지 않을 것.

(2) 分離된 物質이 固定相 移動相과 不可逆的인 反應이 일어나지 않을 것.

(3) 分離된 物質이 재차 系로부터 용이하게 溶出될 것.

(4) 分離 物質에 對한 捕集 容量 또는 이온 交換 容量이 충분히 크고 잘 分離될 것.

(5) 固定相은 高度로 분산되어 있고 移動相은 固定相 사이를 適當한 速度로 移動할 수 있을 것.

上記와 같은 條件을 가질 必要가 있다.

여기서는 操作法上 Column Chromatography 에 관하여 그 概要 및 化粧品의 成分 分析의 利用에 대하여 설명하고자 한다.

1. Adsorption Chromatography

어떤 혼합 물질이 溶液(또는 氣體)의 상태에 서 多孔性의 媒體, 이온 交換수지등의 層을 通過하여 吸着力의 差에 의하여 分離하는 方法이다. 吸着된 物質과 溶液中에 溶存하여 있는 같은 物質과의 사이에 動力學的인 平衡이 있고 吸着된 物質은 溶媒가 移動하는데 따라서 溶出—吸着—溶出의 現象을 반복한다. 物理化學的인 性質이 비슷한 物質일때 처음에는 같은 吸着帶로서 吸着되지만 展開에 따라 吸着帶는 移動하고 근소한 吸着力의 差로 인하여 移動 速度가 다르

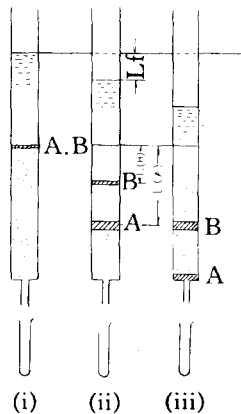


그림 I 吸着帶의 移動

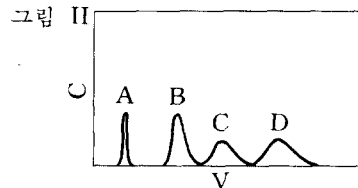
게 되고 따라서 成分이 分離되게 된다. 展開時에 있어서 각 成分의 移動 狀態를 그림 I에 나타내었고 分別帶의 相對的 移動 速度는 分別帶의 移動 距離(L)와 液面의 移動 距離(L_f)의 比를 $L/L_f = R$ 로 나타내고 이 R를 溶離定數라고 부른다. 또 그림 I의 (iii)의 狀態 즉 分別帶의

中心部가 흘러 溶出할 때까지에 요하는 移動相의 量을 保持容量(V_R)이라고 하고 R 또는 V_R의 값으로 定性 分析을 행한다. Column 下端에 유출한 液을 順次 採取하여 定量 分析을 할 수 있다. Adsorption Chromatography를 吸着機構에 따라서 分類하면 다음과 같다.

- (1) Elution Chromatography(溶出 크로마토 그래피)
- (2) Frontal Chromatography(前端 크로마토 그래피)
- (3) Displacement Chromatography(置換 크로마토그래피)

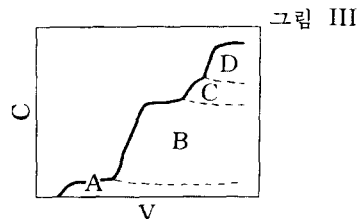
1-1 Elution Chromatography.

數種 物質의 混合物를 吸着劑의 充塡塔에 흘러 보내어 吸着된 後, 各種의 溶劑를 흘러 塔內에 展開하여(즉 한번 吸着된 物質을 溶解하여 溶出) 塔外로 展出하여 分離의 目的으로 하는 樣式을 말한다. 一般의 으로 液體 크로마토 그래피라고 말하는 方法으로서 充塡塔이 길면 分別帶의 幅은 넓게 되고 용질의 濃도가 커도, 分別帶의 幅은 넓게 되어 Tailing現象을 나타내게 된다. 流出液量(V)와 成分 濃度(C)의 관계는 그림 II와 같다.



1-2 Frontal Chromatography

試料를 連續하여 Column에 흘러 보내는 方法



으로서 吸着되기 어려운것 부터 順次的으로 流出한다. 流出 液量(V)과 成分 濃度の 關係는 그림 III과 같으며 混合되는 成分數에 대응하여 階段的인 濃度差를 나타낸다. 용액을 吸着柱(Column)에 흘려 보내면 飽和되어 吸着되지 않은 原溶液이 그대로 流出한다.

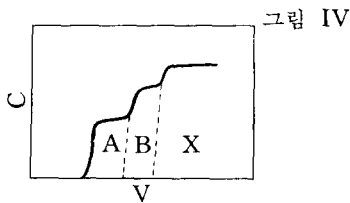
이 경우 比保持容量(Specific retention volume)은 다음과 같으며

$$\frac{\text{溶質을 完全히 捕集가능한 最大限의 溶液量(cc) 吸着劑의 量(g)}}{\text{= 比保持容量}}$$

使用된 吸着劑, 溶媒가 一定하면 各 物質에 대하여 次第로 一定한 값이 되고 比保持容量이 적은 成分으로 부터 順次 最初의 試料 溶液中의 濃도와 같은 濃度로서 流出한다. 따라서 流出液을 次次 分取 조사하면 各 成分의 流出하기 시작하는 前端이 명확하게 된다.

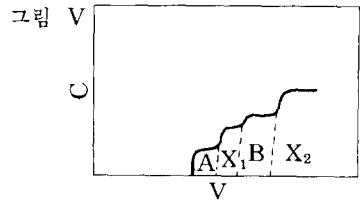
1-3 Displacement Chromatography

試料를 Column에 吸着한후 試料 成分의 어느 것 보다도 吸着되기 쉬운 成分(X)을 含有한 溶液으로서 展開하면 試料 成分은 X에 의하여 置換되고 試料 成分 相互間에도 吸着의 強弱에 의하여 置換되어 吸着성이 弱한것 부터 順次 流出



한다. 그림 IV와 같은 Chromatogram이 얻어진다. 이때 시료 溶液中에 A.B. 두 成分 中間의 吸着性을 갖는 成分(担體—Carrier라 부른다)을 섞어 넣으면 그림 V와 같이 分離되게 되고 容易하게 分離 가능한 Carrier를 選擇하면 試料 成分의 單離도 可能하다.

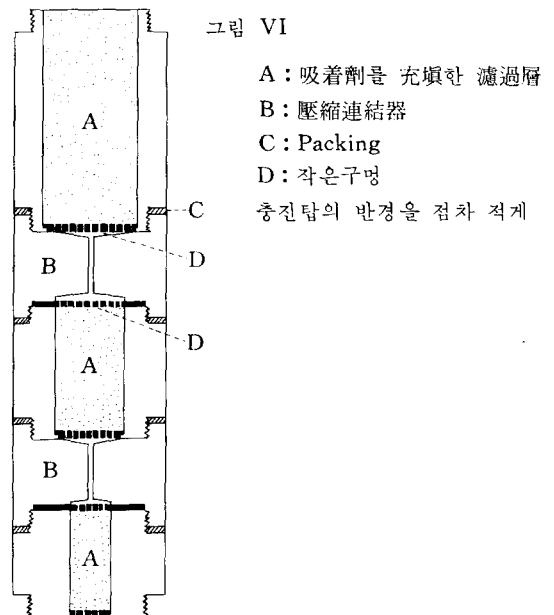
Displacement Chromatography는 1943년 Tiselius에 의하여 提唱된 것으로 주로 同族體의 分離에 使用된다. 이 方法의 利點은 다음과 같



다.

- (1) 測定되는 物質의 量이 形成한 分別帶의 넓이에 比例하여 吸着能이 強한 物質에도 Tail-ing되지 않고 分離할 수 있다.
- (2) 分別帶가 高濃度를 保持하기 때문에 檢出이 容易하다.
- (3) 担體(Carrier)가 알려져 있으면 分離의 狀況을 說明하는 일도 容易하다.
- (4) 分別帶 相互의 距離를 그 사이에 存在하는 Carrier등에 의하여 넓게 좁게 加減할 수 있다.
- (5) 이 方法을 吸着塔에 應用 이온 交換塔이나 置換 分配塔에 適用도 可能하다고 생각 한다.

1-4 Multiple Development (多樣性 展開法)



先端 分析이나 置換 Chromatography에서는 塔의 下端으로 부터 分別帶가 展出될 때에 塔內의 充填이 均一하지 않기 때문에 Tailing을 일으킬때가 많다. 이러한 결점을 없애기 위하여 考案된 裝置로 그림 VI와 같으며 이 操作을 數回 反復함에 따라

- (1) 分別帶의 不規則性이 調整되고
- (2) 親和性的의 差가 적기 때문에 겹치는 두개의 分別帶도 다음 단계에 明瞭한 分離를 나타내며
- (3) Tailing 現象이 防止된다.

2. Partition Chromatography

二液相에 對한 溶質의 分配 係數를 利用한 Chromatography의 한 方法으로서 分配 係數를 달리하는 溶質의 混合物를 二液相 間에 反復하여 分配하여 分離하는 것이다. 하나의 溶液(固定相)이 固體의 担體에 保持되어 있는 것을, 溶質을 溶解한 다른 용액(移動相)을 通過하면 溶質은 分配 係數에 따라서 固定相에 分配되어, 固定相에 對한 分配 係數가 큰 溶質은 流下 速度가 늦게 된다. 一定 溫度에서는 固定相과 移動相이 同一하면 같은 溶質의 流下 速度는 一定하다. 溶質을 溶解한 溶液에 連續하여 溶質을 含有하지 않은 溶液(移動相)을 흘려 展開하면 溶質 成分은 分別하여 流出되기 때문에 流出液을 一定量씩 分取하여 그중의 溶質을 適當한 方法으로 定量한다. 固定相에 水 또는 水可溶性의 極性 溶媒를 利用하는 方法에 대하여 Paraffin, Isooctane 등의 無極性 溶媒를 利用하는 方法을 逆相 分配 Chromatography(Reversed phase partition Chromatography)라고 한다.

3. Ion-Exchange Chromatography

이온 交換體의 交換 反應을 利用하여 행하는 Chromatography이다. 一般적으로 이온 交換 樹脂를 利用하며 column에 이온을 捕集하여 適當한 電解質 溶液으로 展開한다. 이온은 이온 交換 樹脂에 選擇적으로 捕集되기 때문에 展開에 의하여 그 選擇性的의 差에 의한 吸着帶의 移動 速

度, 즉 溶離 定數를 달리 하기 때문에 각 이온의 分離가 行하여 진다. 아미노산, 유기산, 유기염기 등의 分離에 主로 이용된다.

4. Gel-Permeation Chromatography

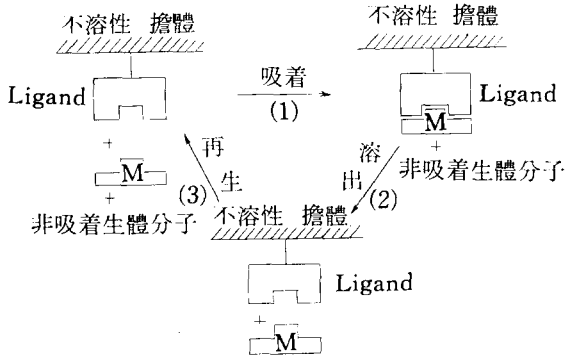
三次元 網目 構造를 갖는 gel 粒子 內部에 物質의 浸透性 差를 利用하여 分離를 행하는 形式의 Chromatography이다.

原理적으로는 gel 過濾법과 같다. 操作은 通常의 column Chromatography를 준비하여 使用하는 溶離劑 中에서 충분히 膨潤된 gel의 column에 試料를 添加한 後 常法에 따라서 展開 溶出한다. 이 경우 gel 粒子의 細孔의 크기 보다 큰 分子는 Column內 粒子의 사이를 통하여 신속히 溶出하지만 작은 分子는 Gel 粒子의 細孔 內部에 까지 浸透하기 때문에 Column內에서의 移動 速度가 늦다. 즉 分子의 크기의 차이에 따라서 分離 可能하다. 이 方法에 있어서 固定相으로서 Gel은 主로 架橋 Polystyrene이 利用되지만 架橋 天然 Gum, Chlorobutyl Gum 등도 使用할 수 있으며 移動相으로서는 試料에 對한 溶解度가 크고 gel과 같은 極性을 갖고 沸點이 比較的 높고 한편 점도가 낮은 物質, 예를들면 Chloroform, Tetrahydrofuran, O-dichlorobenzene, 등이 利用된다. 適當한 크기의 細孔을 갖는 gel을 選定하여 이용하는데 따라 넓은 分子량 範圍의 물질 分別이 可能하기 때문에 Polyethylene, Polystyrene 등의 分子량 분포의 測定이 行하여 진다.

5. Affinity Chromatography (1)

많은 生體 高分子는 特定の 物質과 持異적으로 結合하는 固有의 性質이 있다. 酵素와 反應의 第一段階에서 基質, 抗體와 抗原, m-RNA와 DNA, 相補적으로 結合한다. 이 結合은 主로 이온 結合, 水素結合, 疎水結合 등에 기초를 둔 것이지만 Affinity-Chromatography는 生體 高分子만의 生物學的인 特性을 利用한 것이다. Affinity-Chromatography의 概略을 도표로 나타내면 그림 (VII)와 같다.

그림 VII



M: 目的으로 하는 生體高分子

精製하려는 生體 高分子에 親和性的 어떤 物質(吸着劑 또는 Ligand라고 부른다.)을 不溶性 担體에 化學的으로 結合하여 不溶化한다. 그 不溶化한 Ligand를 Column에 충전하여 生體 抽出液 등의 試料를 그 Column에 통하여 目的하는 生體 高分子은 吸着되지만 다른 불필요한 生體 分子는 吸着되지 않고 Column을 통과한다. 이 吸着되어 있는 生體 高分子을 얻을 수 있다. 使用한 Column은 원래의 상태로 되어 使用할 수 있다.

Affinity-Chromatography는 生體 高分子이 精製 이외에 다음과 같은 것에도 利用된다.

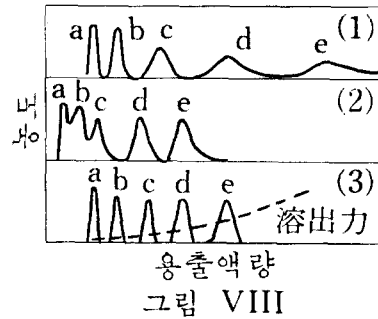
- (1) 酵素나 단백질의 濃縮
- (2) 酵素의 反應 機構의 研究
- (3) 化學 合成한 Peptide의 精製등에 利用된다.

Affinity-Chromatography의 特徵은 無數의 生體 高分子의 混合物로부터 어떤 特定の 것을 比較的 簡單한 操作으로서 短時間에 高度로 精製할 수 있다. 특히 不安定한 酵素나 變性되기 쉬운 蛋白質의 精製에 생각지 않은 효력을 發揮하는 일 이 있다. 그러나 目的으로 하는 蛋白質에 대응하여 Affinity-Column을 製作하지 않으면 안 되고 처음에 그 蛋白質의 固有 性質을 周知할 필요가 있는 등 여러 條件이 要求된다.

6. Gradient Elution(傾斜 抽出法)

展開 溶劑의 組成比, pH, 濃度, 極性, 溫度 등을 連續的으로 變化하여 溶出을 行하는 方法이다.

溶出力이 작은 展開液을 使用하면 그림(VIII)의 (1)과 같이 溶離 定數가 작은 物質의 溶離에는 多量의 展開液을 필요로 하고, 溶出 曲線도 낮아 正確한 定量 分析이 곤란하다. 반대로 溶出力이 큰 展開液을 使用하면 그림(VIII)의 (2)와 같이 溶離 定數가 큰 物質의 分離가 不完全하다. 이와 같은 경우 溶出力이 큰 溶劑와 작은 溶劑를 混合하여 展開液의 溶出力을 점차 連續



的으로 上昇하는 傾斜抽出法을 適用하면 그림(VIII)의 (3)과 같이 全成分이 少量의 展開液으로서 良好한 分離를 할 수 있고 展開液의 溶出力을 點線과 같이 曲線의으로 上昇하면 Tailing現象을 防止할 수 있다.

II. 化粧品 分析의 利用

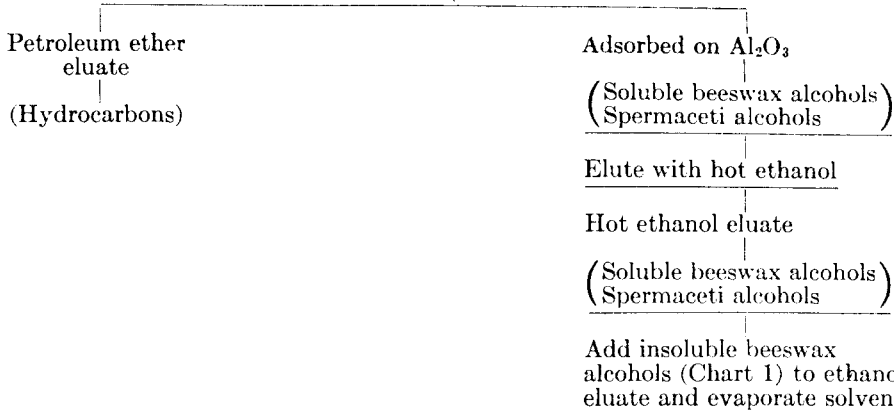
Adsorption Chromatography는 Hydrocarbon, wax, Alcohol의 分離, Nail lacquer중의 Comp-hor의 分離등 化粧品의 分析에 應用된다. Hydrocarbon, Wax, Alcohol들의 分離는 活性化된 Al_2O_3 Column에 Petroleum ether을 溶出液으로 하여 Hydrocarbon과 Wax는 溶出되고 Column에 吸着된 Alcohol은 Hot Ethylalcohol로서 分離한다. (2)

이것을 나타낸 것이 Chart-1과 같다.

Ion-exchange Chromatography 또한 Zinc 및

Chart 1. Chromatography of hydrocarbons, spermaceti alcohols, and soluble beeswax alcohols

Chromatograph petroleum ether solution of hydrocarbons, spermaceti alcohols, and soluble beeswax alcohols on an Al_2O_3 column



Aluminum의 分離(3), Shampoo에서의 Alkyl sulfate, Fatty acid-alkanolamine의 分析(4)에 이용된다. Shampoo의 弱酸性化한 Alcohol溶液을 Anion-exchange Column을 通過하면 Alkyl sul-

fate는 Column에 吸着되고 Alkanolamide와 Soap는 溶出 된다. Alkyl sulfate는 Ammonium carbonate를 함유한 Ammoniacal methanol溶液으로서 Alkyl Aulfate의 암모늄염으로 分離한다.

Chart 2. Scheme of analysis for shampoo

Dissolve in acidified alcohol and chromatograph on weakly basic ion-exchange resin, eluting with acidified alcohol

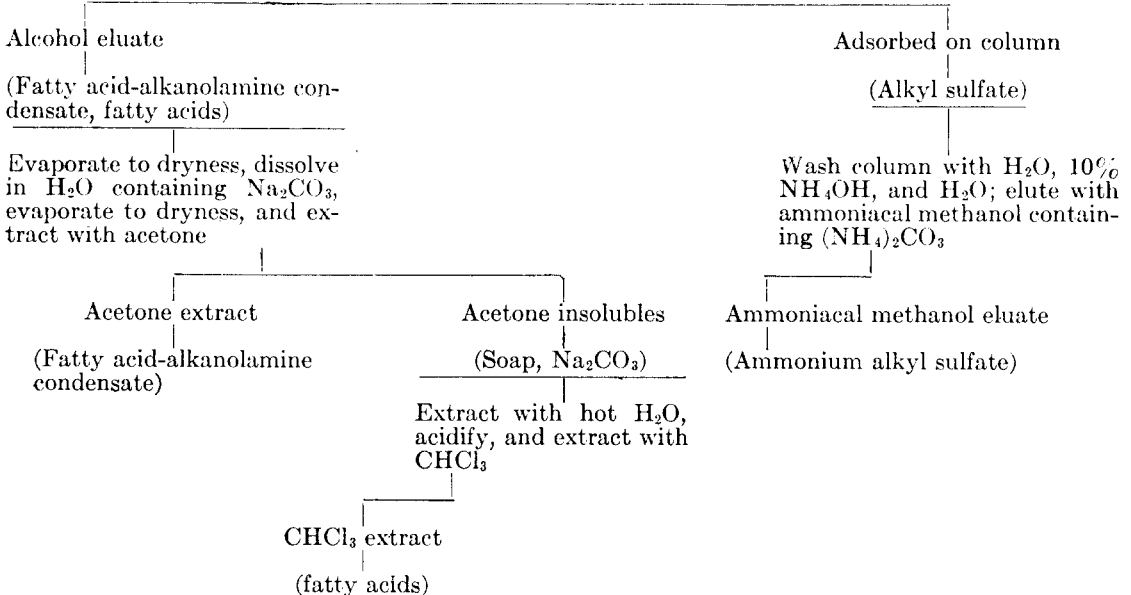
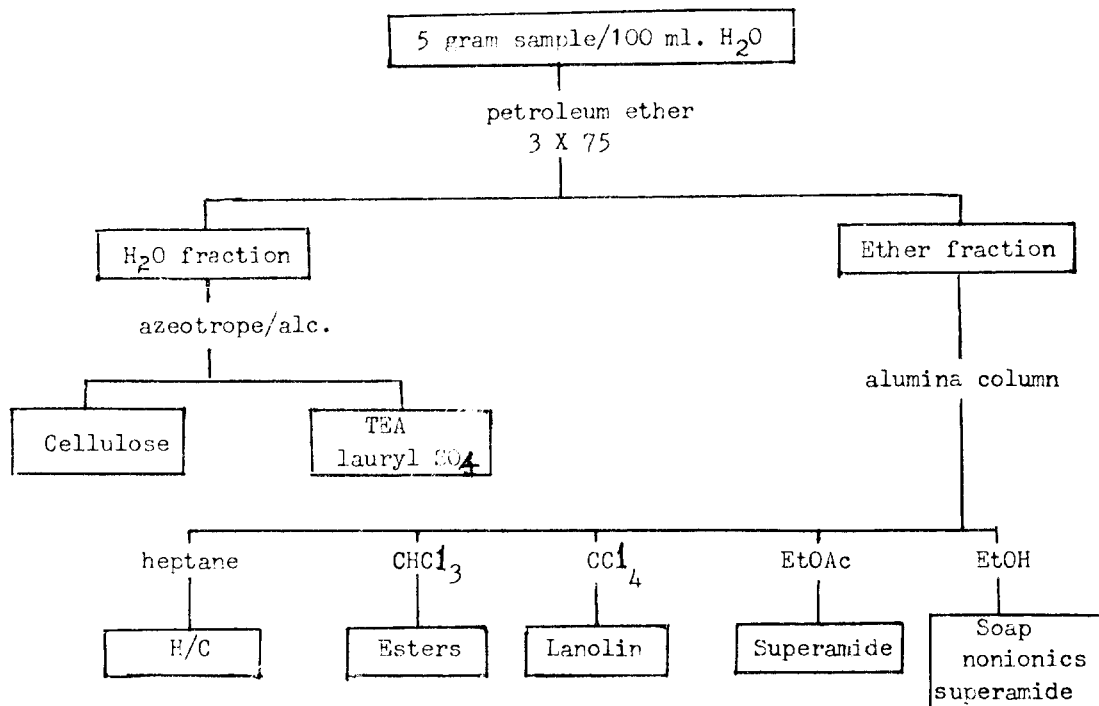


Chart 3. Separation of a shampoo into its component parts



Shampoo의 분석을 나타낸 것이 Chart—2와 같다. 이외에 Shampoo의 분석에 이용한 (5) 것이 있으며 그 내용을 나타낸 것이 Chart—3와 같다. Lipstick의 분석에도 이용되었고 (6) 이것을 Chart—4에 나타 내었다. 이와같이 Column Chromatography의 應用은 一般 化學의 方法에 의하여 分離가 곤란한 것들을 解決할 수 있으며 Gas-Chromatography, Thin Layer Chromatography, Infrared Spectrophotometer, Ultraviolet Spectrophotometer 등 適當한 分析 機器와 一般 化學的인 分析 試驗을 병행하면 化粧品의 基礎 構成 成分의 거의 完全한 分析이 可能하다고 생각한다.

Selected References

- (1) Japan Analysis 23, 525(1974)
- (2) J. Assoc. Offic. Agr. Chemists, 39, 391(1956)

- (3) *Ibid.*, 36, 791(1953)
- (4) *Ibid.*, 41, 664(1958)
- (5) Analytical Chemistry: 39, 24A(1967)
- (6) *Ibid.*, 39, 22A(1967)

General References

- 橋本庸平: 薄層 Chromatography
 日本分析化學會: 分析化學 便覽(1961)
 共立出版: 分析化學 辭典(1971)
 桑田智: 續 Chromatography (I) 01957)
 I. M. Kolthoff and E.B. Sandell: Quantitative
 Chemical Analysis (1971)
 Sylvan H. Newburger: A manual of Cosmetci
 Analysis (1962)

Chart 4. Separation of a lipstick into its component parts

