

화장품 중 항산화제인 초산토코페롤의 분석

독성약품팀

김유경 · 이상미 · 홍윤정 · 김동규 · 김성원

The analysis of tocopherol acetate as an antioxidant in cosmetics

Toxicopharmaceutical Team

**Yoo-kyoung Kim, Sang-me Lee, Yun-jung Hong,
Dong-gyu Kim, and Sung-won Kim**

Abstract

This study was carried out to determine tocopherol acetate in cosmetics. 25 kinds of cosmetics such as creams, packs, lotions, essences, oil and balm containing tocopherol acetate were analyzed.

The obtained results were as follows;

1. The analytical method was applied with High performance liquid chromatograph method using μ -Bondapak C₁₈ column with 100% methanol as mobile phase at 280nm.
2. Two extraction method was used in 25 kinds of cosmetics. Method 1 was that samples were dispersed with 15ml of methanol, filled up with methanol to 50ml and sonicated for 20 minutes. Method 2 was that samples were dispersed with 15ml of chloroform, filled up with methanol and sonicated for 20 minutes.
3. The calibration curve showed good linearity having r values of 0.9984(method 1) and 1.0000(method 2) at the range of standard concentrations in 1 and 2 method ; tocopherol acetate(0.2, 1, 2 mg/ml) was used as standards. The retention time of tocopherol acetate was 7.78 in both methods.
4. Recovery rates were obtained as 99.4 \pm 1.41% in cream, 89.6 \pm 1.93% in pack and 97.8 \pm 1.20% in lotion.
5. Samples were extracted using two extraction methods. Generally method 2 showed better results in the extraction of tocopherol acetate than method 1, except 1 case of pack.

Key words : tocopherol acetate, antioxidant in cosmetics

서론

화장품은 과거 피부의 보습, 보호가 주 기능이었으나,

최근 소비자의 다양한 욕구와 원료 및 관련제조 기술의 발달로 다양한 기능을 갖는 화장품의 생산·공급이 증대되고 있으며, 오존층의 파괴로 인하여 강한 자외선을 피

부에 직·간접적으로 접촉하게 되어 기미, 주근깨, 잡티 등 피부의 색소 침착을 일으키고 장기간 자외선 노출에 의한 피부노화와 암 발생 등을 야기한다. 이러한 자외선에 의한 손상으로 야기된 활성산소에 의한 산화적 스트레스를 방지하기 위하여 아스코르빈산, 멜라닌, 비타민 E 같은 항산화제에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다.

¹⁾ 항산화제란 free radical의 공격으로부터 인체를 보호하는 물질로 인체의 산성화를 방지하는 모든 물질을 말한다. 이 항산화제 중 비타민 E의 효능이 자외선 특히 UVB 영역에 의한 피부손상을 방지해 주는 기능을 가지고 있으며, 레티놀을 함유하는 화장품에서 레티놀의 광분해를 억제하는 효능을 가진다고 한다.²⁾ 비타민 E의 활성을 갖는 화합물 중에서 천연적으로 존재하는 것으로서 알파, 베타, 감마 및 델타-토코페롤과 Isoprenoid side chain에 3개의 이중결합을 가진 알파, 베타, 감마 및 델타-토코트리엔올 등이 있는데 마우스에 국소적으로 적용한 자외선에 의한 암 발생과 DNA 손상을 저해하는 능력을 비교한 결과 알파-토코페롤, 감마-토코페롤, 델타-토코페롤과 초산 알파-토코페롤, 알파-토코페롤 메틸 에스테르 등 유도체 중 알파-토코페롤이 가장 효과적이라고 하며³⁾ 초산 알파-토코페롤은 자외선을 미리 조사한 마우스 피부에서 자외선 노출량에 비례하여 토코페롤로 가수분해된다고 한다⁴⁾

현재 화장품 원료로 사용되는 지용성 비타민 중 비타민 E에는 유도체인 초산 토코페롤, 리놀산 토코페롤, 올레인산 토코페롤 등이 있다. 비타민은 일반적으로 안정성이 좋지 않아 보관 중에 활성이 감소하는 경우가 있으므로 지속적인 함량의 측정이 요구되며 시료 추출과정과 분석방법이 간단하고 신속해야 한다.

따라서, 본 실험에서는 화장품 중 비타민 E 유도체로서 가장 많이 사용되는 초산 토코페롤의 함량을 분석하는데 있어서 신속하고 정확한 분석을 하고자 추출조건을 달리하여 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

초산토코페롤을 함유하는 수입화장품 25종이었고, 사용한 검체 내역은 Table 1과 같다.

사용한 표준품 및 시약은 tocopherol acetate

Table 1. The classification of samples

type	number	manufacturing country
cream	14	S(1) G(8) I(3) GB(2)
lotion	4	G(1) GB(2) U(1)
pack	3	G(1) I(1) S(1)
essence	2	G(1) S(1)
balm	1	G(1)
oil	1	G(1)
	25	G(13) I(4) GB(4) U(1) S(3)

* G : Germany, I : Italy, GB : Great Britain,
U : USA, S : Spain

(Sigma Chemical Co.), chloroform (Junsei Chemical Co.), methanol (Natsunoen chemicals ltd.) HPLC/Spectro-용 methanol (Tedia company) 을 사용하였다. 기기는 717 plus autosampler, 486 tunable absorbance detector, 510 HPLC pump (Waters), chromjet integrator (sp Thermo separation products), FS7652H sonicator (Fisher Scientific)를 이용하여 분석하였다.

2. 실험방법

1) 검액의 조제

초산토코페롤을 1mg/ml 정도 함유하도록 검체를 취하여 두가지 방법으로 추출하여 검액으로 사용하였다. 방법1은 검체를 전량의 3/10에 해당하는 메탄올로 분산시킨 후 메탄올로 표선까지 채워서 20분간 sonication하여 검액으로 하였다. 방법2는 검체를 전량의 3/10에 해당하는 클로르포름으로 분산시킨 후 메탄올로 표선까지 채워서 20분간 sonication하여 검액으로 하였다.

2) 표준액의 조제

초산토코페롤을 100mg 해당량을 취하여 방법1 및 방법2로 추출하여 표준원액을 조제하였다(2mg/ml).

3) 검량선 작성

위의 표준원액을 각각 원액, 2배 희석액, 10배 희석액으로 하여 세가지 농도 0.2, 1, 2mg/ml의 표준액을 조제하여 각각 10 μ l를 Table 2의 조건으로 HPLC로 분석하여 얻은 peak area를 이용하여 검량선을 작성하였다.

4) 회수율 측정을 위한 검액의 조제

표준용액 일정량을 시료에 골고루 혼합 후 방법2로

Table 2. Analytical condition of HPLC.

Colum	μ-Bondapak C ₁₈
Detector	280nm
Flow rate	0.6ml/min
Injection volume	10 μl
Mobile phase	100% methanol
Chart speed	0.25cm/min

추출하여 회수율 측정에 사용하였다.

5) 확인 · 함량 및 회수율 측정

위의 방법에 따라 조제된 검액을 Table 2의 조건에 따라 HPLC를 이용하여 각 시료 중에 함유된 초산 토크페롤을 확인하였으며 표기량에 따른 함량을 계산하고 회수율을 구하였다.

결과 및 고찰

본 실험은 수입화장품 25종에 대하여 추출방법을 바꾸어가면서 초산 토크페롤이 최적으로 추출될 수 있는 조건을 조사하고, 그 추출방법에 의하여 25종의 화장품을 추출하여 HPLC로 분석하여 (Table 3) 초산 토크페롤을 확인하고 함량을 구하였다 (Fig. 1)

검체 중 크림제, 로션제, 팩제 중 1개씩을 무작위로 취하여 메탄올 전량으로 추출하고(방법1), 다른 추출방법으로 메탄올에 클로르포름을 5%에서 50%까지 비율

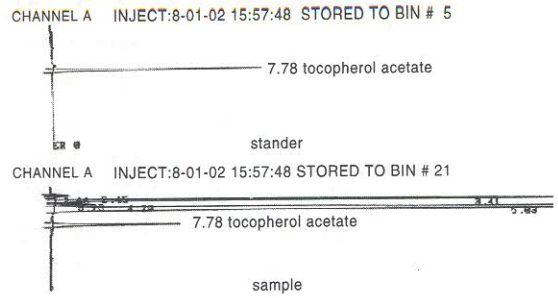


Fig. 1. Chromatograms of tocopherol acetate in standard and sample solution.

을 증가시켜 추출하였다. 메탄올만으로 추출한 경우 26.0%, 클로르포름 10%로 추출한 경우 70.5%, 클로르포름 20%로 추출한 경우 90.6%, 클로르포름 25%로 추출한 경우 97.3%, 클로르포름 30%로 추출한 경우 98.1%, 클로르포름 35%로 추출한 경우 95.4%, 클로르포름 40%로 추출한 경우 95.0%, 클로르포름 50%로 추출한 경우 95.3%의 결과를 보여, 30%까지는 초산 토크페롤의 추출률이 메탄올만으로 추출한 경우에 비해 비례적으로 증가하다가 그 이후 감소하는 경향을 보여서 메탄올에 클로르포름 30% 비율로 추출하기로 하였다(방법2). 클로르포름으로 전량 추출한 경우에는 팩제는 거의 추출이 되지 않았다.

검체 중의 초산 토크페롤을 방법1로 추출한 경우 표기된 함량과 비교하였을 때 25건 중 1건만이 표시량의

Table 3. Assay of tocopherol acetate in 25 kinds of samples.

ND : Not Detected.

sample No.	sample type	labeled content (mg/g)	analyzed content by Method 2(%)	analyzed content by Method 1(%)	sample No.	sample type	labeled content (mg/g)	analyzed content by Method 2(%)	analyzed content by Method 1(%)
1	balm	3	117.1	70.4	14	cream	5	115.9	33.9
2	cream	8	ND	ND	15	cream	30	128.5	58.1
3	cream	5	7.3	4.1	16	lotion	20	25.5	19.5
4	cream	6	46.2	39.2	17	lotion	5	83.9	78.0
5	cream	8	65.5	18.7	18	lotion	5	87.0	28.4
6	cream	5	87.6	53.7	19	lotion	5	87.1	47.5
7	cream	10	88.0	43.5	20	pack	5	ND	ND
8	cream	15	95.4	42.4	21	pack	6	5.4	48.2
9	cream	20	100.2	78.7	22	pack	28	118.4	95.0
10	cream	10	102.5	57.8	23	oil	50	106.6	43.2
11	cream	30	107.0	61.8	24	essence	10	72.1	33.6
12	cream	30	112.1	79.3	25	essence	20	110.5	60.4
13	cream	75	115.2	38.3					

90%이상이었고, 표기량의 50-80%만이 추출된 경우가 9건, 20-50%인 경우가 10건, 20%이하가 3건, 불검출이 2건인 반면, 방법2로 추출한 경우에는 표기량의 90%이상이 13건이고, 80-90%가 4건, 60-80%가 2건으로 60%이상이 19건이었고, 2건은 각각 25%와 46%이었고, 2건은 불검출로서 방법1로 추출한 경우와 거의 차이가 없었으며, 1건은 방법1로 추출하였을 때 48%를 나타낸 반면, 방법2로 추출한 경우에는 5%만이 추출되어 다른 검체와 상반된 결과를 나타내었다. 이상의 분석 결과 방법2로 추출한 검체가 방법1로 추출한 검체에 비하여 양호한 추출율을 보였으며, 두 방법 모두에서 불검출인 검체의 경우에는 표시량에 표기된 성분이 들어있지 않다고 생각된다.

표준액의 크로마토그램의 경우에 방법1, 2 각각 0.2, 1, 2mg/ml 농도로 검량선을 작성한 결과 각각의 직선식 및 상관계수 값은 $y=3.3879 \times 10^6 x - 28890$, $r=0.9984$, $y=3.8863 \times 10^6 x + 10937$, $r=1.0000$ 로 두 추출조건간에 차이가 거의 없이 양호한 직선관계를 보였고, 머무름시간도 7.78로 동일하였다(Fig. 2~3)

방법2로 크림제, 팩제 및 로션제에 대한 초산 토크페롤의 회수율을 구한 결과, 크림제에서는 $99.4 \pm 1.41\%$, 로션제의 경우에는 $97.8 \pm 1.20\%$ 로서 비교적 양호한 회수율을 나타내었으나, 팩제의 경우에는 $89.6 \pm 1.93\%$ 로 다소 낮은 회수율을 나타내었다(Table 4). 이 팩제의 경우 클로르포름보다 메탄올만으로 추출한 경우에 더 나은 추출율을 나타낸 것으로 보아 기체가 수용성에 더 근접하여 회수율이 낮아진 것으로 추정되며, 클로르포름을 포함하는 추출용매에서도 함량이 다양하게 나타난 것은 초산 토크페롤이 상당히 안전한 화합물이지만 시간경과에 따라 변성이 일어난 것이 아닐까 추정된다.

대표적인 항산화제로 베타-카로틴, 비타민 E, 비타민 C, 코엔자임 Q10, 녹차의 카테킨(EGCG) 등이 있고 비타민 E의 경우 알파-토크페롤의 항산화작용이 가장 우수한 것으로 알려져 있다⁵⁾. 토크페롤이 기능성 화장품 원료로 지정되어 있지는 않으나, 피부노화와 상당한 관련성을 가지는 활성산소를 제거해 주는 항산화작용이 탁월하므로 이에 대한 확인, 함량 등에 대한 연구가 장기적으로 필요하며 시간경과에 따른 경시변화에 관해서도 추후에 조사해 보려고 한다.

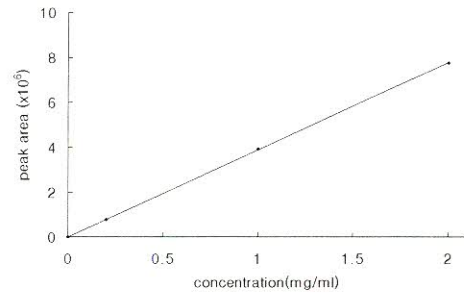


Fig. 2. Standard calibration curve of tocopherol acetate by Method 1.

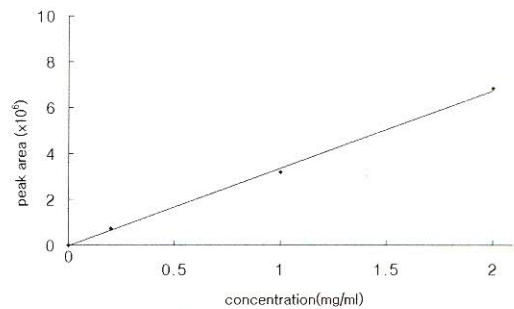


Fig. 3. Standard calibration curve of tocopherol acetate by Method 2.

Table 4. Recovery rate of tocopherol acetate in spiked samples

		1	2	3	MEAN	SD
tocopherol	add(mg/ml)	0.228	0.232	0.219		
acetate	found(mg/ml)	0.231	0.229	0.217		
in cream	recovery rate	101.3	98.7	99.1	99.7	1.41
tocopherol	add(mg/ml)	0.228	0.232	0.219		
acetate	found(mg/ml)	0.201	0.206	0.201		
in pack	recovery rate	88.2	88.8	91.8	89.6	1.93
tocopherol	add(mg/ml)	0.228	0.232	0.219		
acetate	found(mg/ml)	0.226	0.226	0.212		
in lotion	recovery rate	99.1	97.4	96.8	97.9	1.20

결론

초산 토크페롤을 함유하는 수입화장품 25종을 무작위로 선택하여 크림제, 로션제, 팩제, 에센스 등 여러 제형에서 토크페롤의 유도체인 초산 토크페롤을 분석하였다. 두가지 추출조건으로 검체를 추출하여 HPLC로 분석한

결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 초산토크오페롤을 1mg/ml 함유하도록 검체를 취하여 추출용매를 각각 메탄올, 클로르포름을 30% 함유하도록 가한 후 분산시켜서 메탄올로 채워서 검액으로 사용하였다.

2. HPLC 분석조건은 컬럼 μ -Bondapak C₁₈, 이동상은 100% methanol이었으며 검출파장은 280nm였다.

3. 검량선 작성 결과 각각의 직선식 및 상관계수 값은 $y=3.3879 \times 10^6 x - 28890$, $r=0.9984$, $y=3.8863 \times 10^6 x + 10937$, $r=1.0000$ 로 두 추출조건간에 차이가 거의 없이 양호한 직선관계를 보였다.

4. 회수율은 Tocoherol acetate 첨가시 크림제에서는 $99.4 \pm 1.41\%$, 로션제의 경우에는 $97.8 \pm 1.20\%$, 팩제의 경우에는 $89.6 \pm 1.93\%$ 였다.

5. 총 25건중 2건을 제외하고는 초산 토크오페롤이 확인되었고, 메탄올로 분산시켜 메탄올로 추출한 경우보다 클로르포름으로 분산시켜 메탄올로 추출한 경우에 추출율이 증가하였고 클로르포름의 첨가에 따라 점점 추출율이 증가하다가 30% 전후로 다시 감소하였다.

Merk H. : Biomelanin antioxidants in cosmetics: assessment based on inhibition of lipid peroxidation. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 13(3-4):143-9 (2000).

2. Young AM, and Gregoriadis G. : Photolysis of retinol in liposomes and its protection with tocopherol and oxybenzone. *Photochem Photobiol* 63(3):344-52 (1996).
3. McVean M, and Liebler DC. : Prevention of DNA photodamage by vitamin E compounds and sunscreens: roles of ultraviolet absorbance and cellular uptake. *Mol. Carcinog.* 24(3):169-76(1999).
4. Kramerstickland K, Liebler DC : Effect Of UVB On Hydrolysis Of Alpha-Tocopherol Acetate To Alpha-Tocopherol In Mouse Skin *Journal of Investigative Dermatology* 111(2): 302-7 (1998).
5. 하병조 : 기능성화장품 Cosmeceuticals, 신광출판사 (2001)

참 고 문 헌

1. Kalka K, Mukhtar H, Turowski-Wanke A,