J. Soc. Cosmet. Scientists Korea
Vol. 30, No. 1, May 2004, 53-58

동결처리 전자현미경을 이용한 에멀젼 미세구조 분석

이 은 주† · 강 윤 석 · 윤 명 석 · 랑 문 정

LG생활건강 기술연구원

Cryo-Electron Microscopy of Microstructures of Emulsions

Eun-Ju Lee†, Yun Seog Kang, Moung Seok Yoon, and Moon Jeong Rang

LG Household & Healthcare Research Park, 84, Jang-dong, Yusong-gu, Daejeon 305-343, Korea

요 약: 본 연구에서는 에멀젼의 미세구조 분석을 위한 동결처리 전자현미경 분석의 응용에 대해 소개하였다. 동결처리 전자현미경 분석법은 에멀젼의 미세구조 분석 및 해석에 유용하며, 이러한 미세구조 해석을 통해 에멀젼의 유동 특성 발현에 대한 메카니즘의 설명이 가능할 것으로 사료된다.

Abstract: In this study, we describe the application of electron microscopes that incorporate freeze treatments or cryo systems to achieve the characterization of the microstuctures of emulsions. We confirmed that the preparations of freezing replica method and with cryo systems were useful to clarify the microstuctures of the emulsions. This methodology will be able to contribute to understanding the relation between microstuctures and rheology of emulsions.

Keywords: *emulsion, freeze replica, Cryo-TEM, Cryo-SEM*

1. 서 론

에멀젼은 화장품에서 가장 널리 사용되는 제형으로서 에멀젼 성질에 대한 이해는 제품개발에 필수 불가결한 요소이다. 통상적으로 에멀젼의 성질은 점도, 유동특성, 입자크기, phase diagram 등을 이용하여 물리적 측면에서 그 특성을 파악하거나 X-선 회절 측정으로 에멀젼 구조를 해석하여 rheology 거동과의 관계를 관찰하기도 한다. 이러한 macro한 구조 해석과 동시에 에멀젼의 micro한 구조를 직접 시각적으로 관찰, 해석하는 것도 에멀젼 제제화에 매우 중요한 기술정보를 얻을 수 있는 방법이다. 통상의 전자현미경이 10^{-5} torr 이상의 진공상태에서 분석하는 조건을 고려할 때 에멀젼과 같은 액상 시료의 경우 시료 변형 및 chamber의 오염 등으로 액상상태로 분석하는 것은 불가능하다. 이러한 에멀젼의 미세구조를 전자현미경으로 관찰하기 위해서는 시료를 건조시키거나 동결하여 관찰하는 방법을 사용한다.

가장 일반적으로 사용하는 staining법을 이용한 투과전자현미경 분석은 휘발성분을 건조시킨 후 분석하는 방법으로서 시료의 특정 성분과 결합 혹은 용해되는 staining 시약을 사용하여 명암차를 발생, 관찰한다. Figure 1은 negative staining법을 이용한 TEM 이미지의 예이다. 이러한 분석법은 전처리가 단순하고 용이한 반면 희석, 건조 과정에 의한 형상변형이 일어날 수 있으며 특히 oil 함량이 높거나 희석이 어려운 w/o 에멀젼의 경우 분석이 어려운 단점이 있다.

에멀젼 미세구조의 또 다른 분석법으로는 시료를 급속 동결한 후 전자현미경으로 분석함으로 형상변화를 최소화시킨 동결처리법[1]이 있다. 에멀젼 입자크기 및 분석 목적에 따라 분석 장비와 분석기법이 다양하다. 나노에멀젼을 분석하는 TEM법으로는 freeze replica method[1-3] 및 freeze sectioning method (cryo-TEM)[4]가 있으며 마이크로 에멀젼은 cryo-SEM[5-6]을 이용하여 분석한다.

본문에서는 동결처리법을 이용한 각 분석장비별 분석기법에 대해 소개하며 특히 cryo-SEM을 이용한 에멀젼 제형별 유화구조의 예와 유화구조와 유동 특성간의 상관성 해석의 예에 대해 서술하였다.

† 주 저자 (e-mail: ejleeb@lgcare.co.kr)

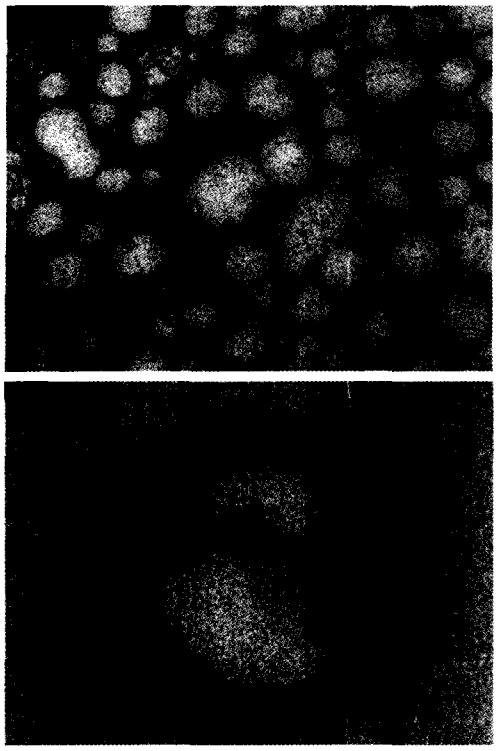

Figure 1. TEM images of the o/w emulsion treated with negative stain method.

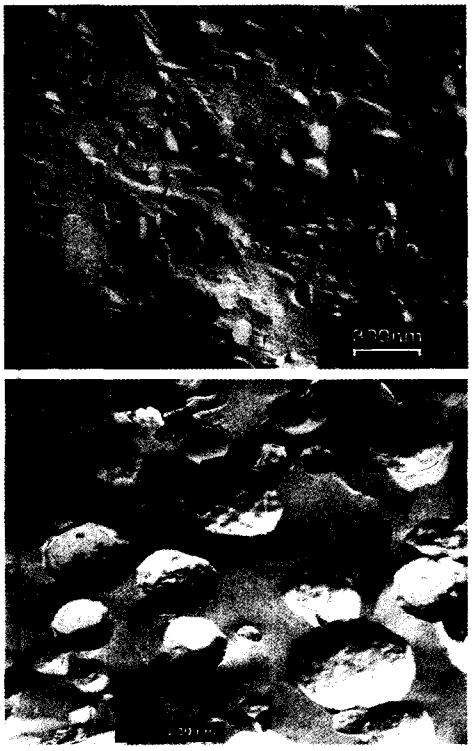

Figure 2. TEM images of the emulsion treated with freeze replica method.

2. 본 론

2.1. Freeze replica method를 이용한 TEM 분석법

에멀젼 시료를 액화에탄으로 급속 동결시킨 후 replica device내의 knife로 파단면을 생성시킨다(fracturing). 생성된 파단면 위에 Pt/C입자를 shadowing하여 표면의 형상을 따라 replica를 만든다. Replica를 grid 위에 올린 후 상온 TEM으로 관찰한다. 시료에 따라 에멀젼 중 휘발성 성분을 승화시키는 etching 과정을 거치기도 한다. Figure 2에 나타난 바와 같이 freeze replica법의 경우 일반적인 TEM 결과와 달리 SEM과 같은 이미지로서 표면 형상에 대한 정보를 제공하는 특징이 있다. 또한 시료를 동결시키므로 건조 과정에서 발생되는 형상변형이 적고 수분이나 기타 휘발 성분의 함량에 따른 에멀젼 제형의 제한이 적다. 그러나 이러한 전처리 과정은 숙련된 경험이 필요하며 에멀젼 내부구조에 대한 재현성 있는 정보를 얻기 어려운 단점이 있다.

2.2. Freeze sectioning method를 이용한 Cryo-TEM 분석법

Cryo-TEM은 TEM내 sample specimen holder mount를 LN_2를 이용하여 180℃로 냉각, 유지시켜 액상시료를 동결한 상태로 분석 가능한 cryo unit를 갖는 TEM 장비이다. 액화에탄을 이용하여 급속 동결시킨 에멀젼을 cryo ultramicrotome을 이용하여 100 nm 두께로 sectioning한 후 외부 오염에 의한 얼음 알갱이(frost)가 발생하지 않토록 진공 및 저온상태를 유지한 cryotransfer를 이용하여 시료를 이송, 냉각된 TEM specimen stage로 장착한 후 동결된 상태의 시료를 직접 관찰하는 분석법이다. Figure 3은 freeze replica 이미지의 예로서 액상 에멀젼을 동결하여 직접 관찰함으로 일반 TEM과 같이 에멀젼 drop의 미세 내부 구조에 대한 정보를 얻을 수 있다.

또한 휘발성 액상성분의 함량이나 에멀젼 제형에 대한 분석적 제한이 적은 장점이 있다. 그러나 freeze replica법과 같이 까다로운 전처리 과정 때문에 숙련된 경험이 필요하다.

2.3. Cryo-SEM 분석법

Cryo-SEM은 cryo-TEM과 같이 SEM내 specimen holder mount를 LN_2를 이용하여 180℃로 냉각, 유지하여 시료를 동결한 상태로 직접 분석하는 장비이다. 동결처리법과 같이 에멀젼을 slush LN_2를 이용하여 동결한 후 cryo transfer를 이용하여 cryo chamber로 옮긴 후 chamber내 장착되어 있는 knife로 파단면을 생성시킨다. 분석 목적에

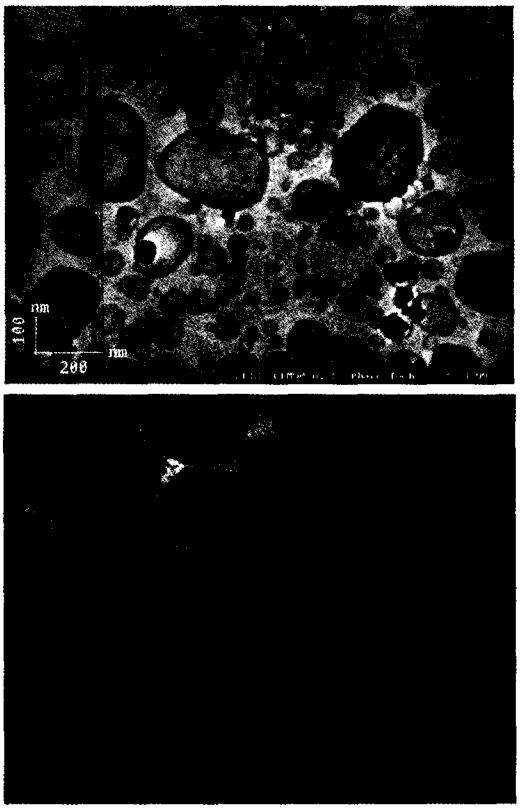

Figure 3. Cryo-TEM images.

따라 에멀젼 내 휘발성 성분을 승화시키는 etching을 한 후 gold coating한다. 180℃로 유지된 SEM내 specimen stage에 장착한 후 관찰한다. Cryo-SEM은 일반 SEM과 동일한 이미지로 얻어지며 분석 결과로부터 에멀젼 제형에 대한 구조정보를 얻을 수 있다. 상기의 TEM 분석 기법들이 전처리 과정에서 숙련된 경험을 요구하는 반면, cryo-SEM법은 전처리가 용이하고 간단한 장점이 있다. 다만, TEM분석 대비 분해능의 저하에 따른 분석한계로 인해 주로 micro 크기의 에멀젼 분석에 이용된다.

본 연구팀에서 보유한 cryo-SEM (Bio-Rad사 E7400, Jeol 840A)을 이용하여 에멀젼 제형별 미세구조를 분석해보았다.

2.3.1. Air in water 에멀젼

Form과 같은 제형의 경우, form의 사용감이나 안정성은 water내 air의 크기 및 안정화 기제에 의해 영향을 받는다. 통상의 form 구조는 Figure 4와 같이 water 층내의 계면활성제 혹은 기타 안정화제에 의해 생성된 네트워크 구조로서 네트워크의 pore크기 및 wall thickness로부터 유동 특성을 해석할 수 있다.

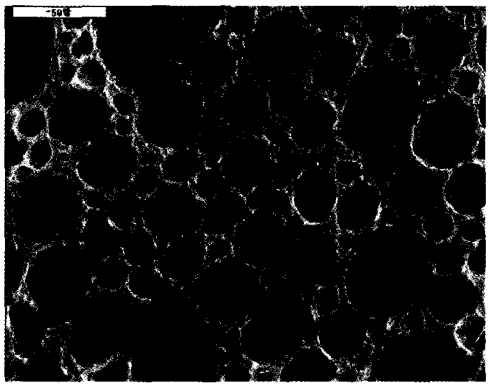

Figure 4. Cryo-SEM images of shave form.

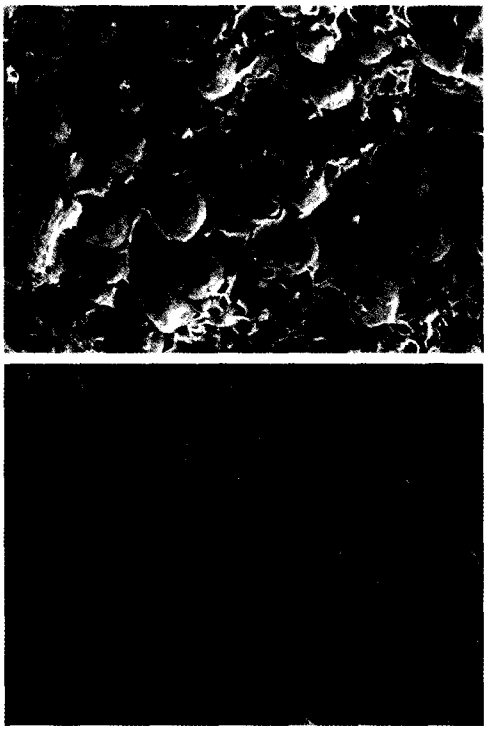

Figure 5. Cryo-SEM images of o/w emulsion.

2.3.2. Oil in water 에멀젼

기초화장품에서 가장 많이 널리 사용하는 제형으로, 에멀젼내 water 성분을 승화(etching)시키면 Figure 5와 같이 oil drop들이 positive Image로 나타나며 oil drop의 형상, 크기, 기타 구조체의 정보를 얻을 수 있다. 통상적으로 사용하는 광산란법을 이용한 입자 크기 측정 시 발생할수 있는 희석에 의한 크기 변형 없이 측정 가능한 장점이 있다. 또한 liquid crystal을 형성하는 에멀젼의 경우, Figure 6과 같이 multilamellae 구조체가 나타나는 것이 특징이다. 조성에 따라 open type의 multilayer 구조 혹은 close type의 multilayer drop이 생성된다. Layer

Figure 6. Cryo-SEM images of the liquid crystal structure of emulsion.

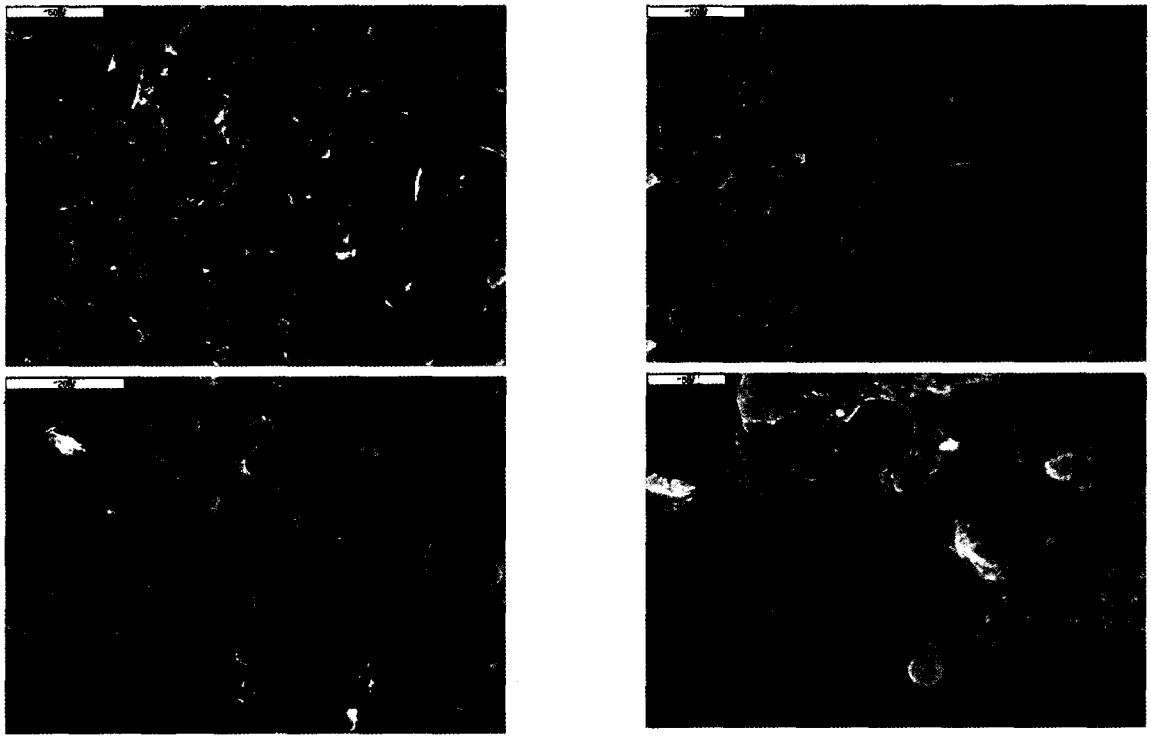

Figure 7. Cryo-SEM images of Liquid foundation.

간의 간격이나 두께에 따라 유동특성 및 유효성분의 전달, 안정화에 영향을 준다.

2.3.3. Water/powder in oil 에멀젼

기초화장품에서 주로 사용하는 o/w, w/o제형에 대한 에멀젼 미세구조에 대한 연구는 발표, 보고 되어지고 있으나 powder, wax가 함유된 색조 화장품의 에멀젼 구조에 대해서는 보고된 바가 없다. Figure 7은 색조화장품 중 liquid foundation의 유화구조로서 oil상내 water drop은 negative image로, powder는 positive image로 나타난다. 유화구조에 대한 시각적 관찰은 효과적인 water 및 powder 분산에 대한 정보를 제공한다.

2.3.4. Water in Wax 에멀젼

일반적으로 마스카라 제형을 water in wax 에멀젼으로 추론하나 마스카라 유화구조에 대해 시각적으로 해석한 자료는 보고된 바가 없다. Figure 8은 본 연구팀에서 보유한 cryo-SEM을 이용하여 마스카라의 유화구조를 분석한 결과로서 대부분의 마스카라에서 특유의 네트워크 구조가 관찰되었다. 이러한 네트워크 구조는 조성이나 제조조건에 따라 상이하며 마스카라의 유변특성과 관계있는 것으로 사료된다. Table 1 및 Figure 9는 동일 조성을 갖는 마스카라의 경우, 제조 조건에 따라 상이한 경도 및 유화구조를 갖는 예로서 경도가 높은 시료의 경우 상대적으로 조밀한 네트워크 구조를 갖는 것을 알 수 있다.

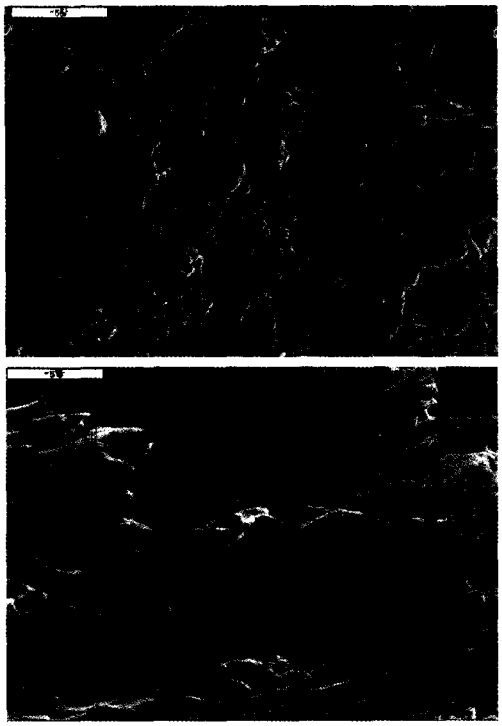

Figure 8. Cryo-SEM images of mascara.

분석결과 이러한 네트워크 변화는 제조조건 변화에 따른 Wax의 유화상태와 관련된 것으로 추론되며 향후 조성과 제조조건의 변화에 따른 Wax 유화 및 구조체 영향과 그 메카니즘에 대한 연구가 더 필요하다.

3. 결 론

이상에서 에멀젼 미세구조 분석을 위한 다양한 전자현미경 분석 장비 및 분석법에 대해 알아 보았다. Freeze replica method나 cryo-TEM법의 경우 나노에멀젼과 같은 고분해 분석이 가능하나 숙련된 전처리 기술이 필요한 반면 cryo-SEM의 경우 시료 전처리가 상대적으로 용이한 반면 TEM대비 분해능이 낮다. 최근에는 cryo-

Table 1. Mascaras Used for Cryo-SEM Observations.

Sample	A	B	C
Haredness ($dyne/cm^2$)	34	22	11

FESEM 개발로 고분해능의 에멀젼 분석이 가능하며 특히 cryo-ultramicrotome을 이용한 freeze sectioning method의 응용으로 재현성이 향상된 미세구조 분석[7,8]이 가능해졌다. 효과적인 분석 결과를 얻기 위해서는 에멀젼 입자 및 구조체의 크기, 분석 목적 및 시료 특성을 고려한 분석장비 및 분석법 선택에 필요하다. 또한 본 연구로부터 동결처리 전자현미경은 에멀젼과 같은 액상 시료의 경우 다양한 제형에서 형상 변화없이 에멀젼 미세구조를 관찰 할 수 있는 유용한 장비로서 시각적인 미세구조 해석을 통해 에멀젼의 조성과 제조 조건에 따른 구조와의 관계 및 유동특성의 발현 메카니즘의 설명이 가능함을 알수 있었다.

참 고 문 헌

1. T. Imae and T. Iwamoto, Electron microscopic observation of molecular assemblies in iridescent surfactant solutions, *J. Colloid Interface Sci.*, **152**, 280 (1992).
2. P. K. Vinson, J. G. Sheehan, W. G. Miler, L. E. Scriven, and H. T. Davis, Viewing microemulsions with freeze-fracture transmission electron microscopy, *J. Phys. Chem.*, **95**, 2546 (1991).
3. M, Gasperlin, J. Kristl, and J. Smid-Korbar, J. kerc, The structure elucidation of semisolid w/o emulsion systems containing silicon surfactant, *Int. J. Pharmaceutics*, **107**, 51 (1994).
4. P. Echlin, *Low Temperature Microscopy and Analysis*, Plenum Press, new York (1992).
5. R. C. Rowe and J. McMahon, The characterization

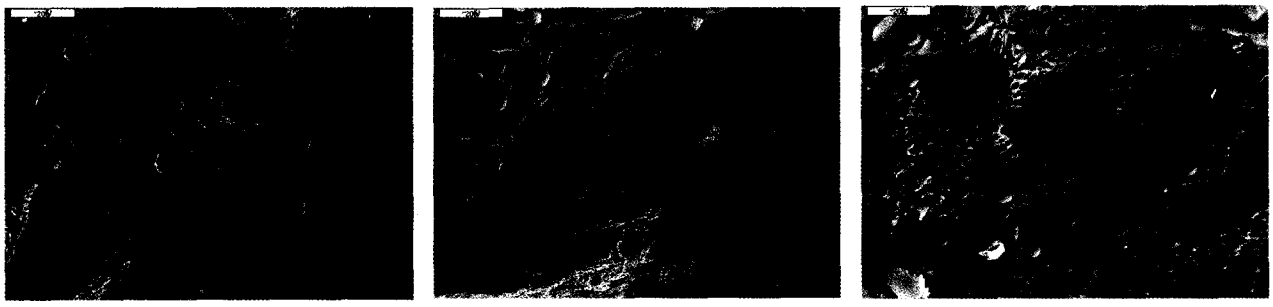

Figure 9. Cryo-SEM images of the mascaras that have different hardness.

of the microstructure of gels and emulsions containing cetostearyl alcohol and etrimide using electron microscopy, *Colloids and Surfaces*, **27**, 367 (1987).
6. M. Yamashita, S. K. Yoshita, M, Tanaka, and S. Fukushima, Observation of internal structure of emulsion particles by cryo-scanning microscope. *J. Electron. Microsc.*, **31**, 249 (1982).
7. M. Yamashita, K. Kameyama, R. Kobayashi, A. Asahina, S. Aita, and K. ogura, *J. Electron. Microsc.*, **45**, 461 (1996).
8. M. Yamashita, S. Aita, and K. Ogura, O/W エマルションの SEM による微細構造解, *J. Soc. Cosmet. Chem. Jpn.*, **32**(1), 52 (1998).