

# HPLC 및 GC에 의한 Kojic Acid 와 Hydroquinone의 同時分析에 關한 研究

生藥科

明魯泓·金明姬·朴承娥·尹源庸

## Analysis on Kojic Acid and Hydroquinone by HPLC and GC

Division of Herb Drug

Noh Hong Myoung, Myung-hee Kim, Seung Ah Park, Won Yong Yoon

### = Abstract =

This study was carried out to develop the analytical method for the kojic acid and hydroquinone simultaneously by HPLC and GC.

The results were as follows:

1. Kojic acid and hydroquinone were separated completely within 15 min by HPLC and 8 min by GC.
2. Mean values of recovery rate were  $97.2 \pm 2.75\%$  (hydroquinone) and  $96.5 \pm 2.35$  (kojic acid).
3. Three samples were detected 96.6-103.2% hydroquinone and three samples were detected 80.7-99.1% kojic acid.
4. Limites of detection were  $5.4 \mu\text{g/mL}$  (hydroquinone) and  $0.11 \mu\text{g/mL}$  (kojic acid) by HPLC.

### 緒 論

上皮的 melanine은 tyrosinase가 媒介가된 tyrosine의 酸化重合에 의해 黑血球에서 生成된다. Mono, dihydroxybenzene 誘導體들은 皮膚나 毛髮의 脫色을 일으킬수있고 黑色으로 着色된 細胞에 選擇的으로 cytotoxic하게 나타난다. Cytotoxicity는 toxic脫色 酸化物의 形成을 仲介하는 tyrosinase의 能力에 左右된다.

In vivo에서 脫色을 形成하는 各種 物質들의 能力은 melanine과 物理的 혹은 化學的 相互關係로 인한것 일것이다. 皮膚 造色(toning)에 가장 많이 使用되는것이 hydroquinone이며 이것은 tyrosine이 melanine으로 轉換하는 것을 抑制한다.<sup>1)</sup> 皮膚色을 一時的으로 밝게하는 vanishing cream에 hydroquinone이 1.5-2.0%가 效果의인것으로 報告되어있다. 또한 kojic acid도 tyrosinase의 catecholase 活性을 抑制하므로 優秀한 美白效果를 나타내므로<sup>2)</sup> 기미, 주근깨, 皮膚美容等に 使用되어지고있다.

Tyrosinase(polyphenoloxidase)는 一種의 2官能性的 copper 蛋白複合體로 動物의 melanization의 原因이 된다. 그러나, kojic acid가 마치 새로운 皮膚를 再生시켜 주는것으로 誤用되고있으며 hydroquinone은 化粧品으로 使用이 禁止된 狀態이며 다만 醫師의 處方下에 醫藥品으로 許可된 漂白藥用크림에는 使用이 可能하다. 따라서 이 두가지 成分이 서로 混用될 憂慮가 있으나 화장품등에서 同時에 두 가지 成分을 分析할수있는 實驗方法이 報告되어있지않아 本著者들은 HPLC와 GC를 利用하여 두 成分을 同時 分析할 수있는 方法을 研究하여 좋은 結果를 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

### 材料 및 方法

#### 1. 機器

High performance liquid chromatography(Waters 社) (Table 1. 參照)

Gas chromatography(Hewlett Packard 社) (Table 2. 參照)

#### 2. 試藥

使用한 試藥은 methanol( Tedia, HPLC grade)과 MEXIMA(ELGA)를 通過시킨 精製水를 使用하였으며 標準品은 國立保健院에서 分讓받은 hydroquinone과 kojic acid를 使用하였다.

#### 3. 材料

1995-1996年 사이에 試料로 들어온 hydroquinone을 含有한 試料 4件과 kojic acid를 含有한 試料 3件을 使用하였다.

#### 4. 實驗方法

##### 1) 標準液調製

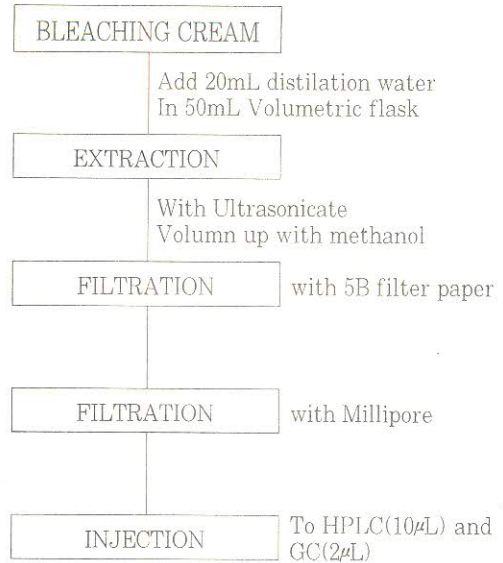


Fig. 1 Systemic Scheme of Extraction Method.

Kojic acid는 20.4mg을 hydroquinone은 40.9mg을 取하여 各 各 50ml 容量 플라스크에 넣고 methanol로 녹여 表線까지 채워 stock solution으로 만들었다. 두개의 stock solution 을 각각 2.5ml, 5ml, 10ml씩 取해 20ml 容量 플라스크에 가한 후 methanol로 表線까지 채웠다. 이들 溶液 10µ씩을 HPLC system에 注入하여 얻은 peak area를 利用하여 檢量線을 作成하였다. (Fig.1)

#### 2) 實驗方法

Hydroquinone과 kojic acid를 各各 含有하고있는 檢體 一定量을 取하여 50ml 容量플라스크에 넣고 20ml의 精製水를 가해 超音波로 抽出한 후 methanol로 表線까지 채웠다. Magnetic stirrer로 교반한후 濾過하여 檢液으로 하였다. (Fig. 2) 이때 測定條件은 Table 1, 2와 같다. 또한 —

Table 1. Analytical Condition of HPLC

Instrument	HPLC(Waters)
Injector	U6K Injector
Pump	Model 501 (Waters)
Column	$\mu$ -Bondapak phenyl Column
Mobil phase	MeOH / Water / Acetic acid (7:90:3)
Flow rate	0.4mL/min
Sample size	10 $\mu$ L
Detector	Model 486 Tunable Absorbance Detector(Waters)
Data module	HP 3395 Intergrator

Table 2. AnalyticalCondition of GC

Instrument	GC Model 5890 II (Hewlett Packard)
Column	Fused silica HP-1 (10m * 0.53mm * 2.65 $\mu$ m)
Detector	F I D
Column Temp.	Initial 120 $^{\circ}$ C for 3 min Rate 10 $^{\circ}$ C/min Final 180 $^{\circ}$ C for 10min
Injector Temp.	180 $^{\circ}$ C
Detector Temp.	230 $^{\circ}$ C
Data module	HP 3395 Intergrator

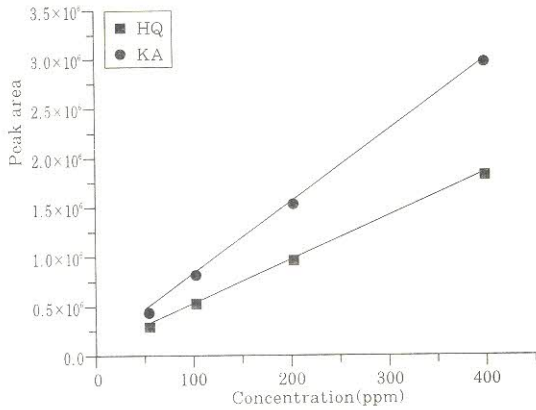


Fig. 2. The calibration curve of hydroquinone(HQ) and kojic acid(KA).

定量的 標準原液을 methanol로 稀釋한 標準液을 hydroquinone이 含有되지 않은 試料에는 kojic acid를 kojic acid가 含有되지않은 試料에는 hydroquinone를 一定量 添加하여 Fig.1과 같이 抽出하여 回收率을 測定하였다.

### 結果 및 考察

Hydroquinone(1,4-Benzendiol)은 白色-엷은 褐色의 針狀結晶으로 빛에 의하여 검게 변한다. Ethanol, 물 등에 잘 녹으며 여드름 治療劑로 2-5% 크림劑가 使用된다.<sup>3)</sup> 酸化防止劑, 現象液 製造 등에 使用되며 LD<sub>50</sub> 은 rat에 있어서 320mg/kg이며<sup>4)</sup> 人體에 낮은 濃度에서는 비교적 安定하다. 1g을 攝取하면 tinnitus, nausea, vomiting

Table 3. Recovery Rates of Spiked Hydroquinone in Cream. (Contain Kojic Acid)

	ADD(MG)	FOUND(MG)	RECOVERY RATE(%)
1	8.056	7.630	94.7
2	8.056	8.056	100.0
3	8.056	7.950	98.7
4	8.056	7.420	92.1
5	8.056	7.950	98.7
6	8.056	7.680	95.3
7	8.056	7.730	96.0
8	8.056	7.880	97.8
9	8.056	7.580	94.1
10	8.056	7.880	96.5
MEAN		7.776	96.5
SE		0.120	2.35
RSD		2.566	2.43

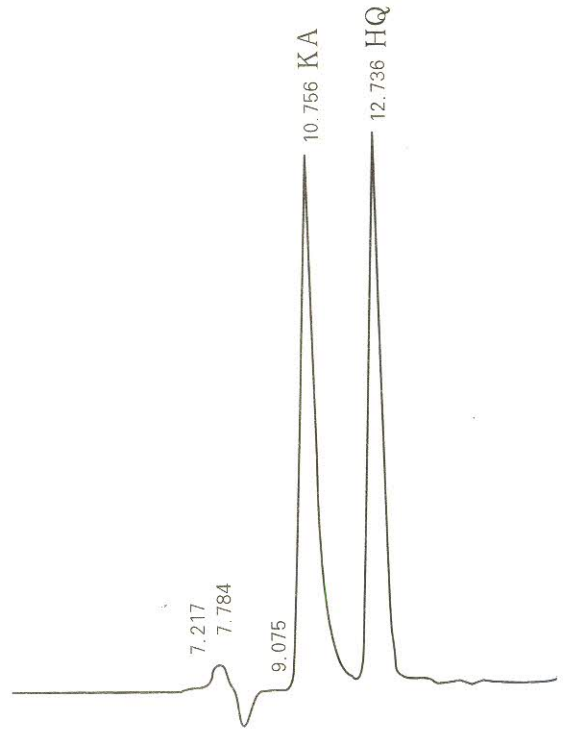


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Hydroquinone(HQ) and Kojic acid(KA) Standard.

, cyanosis, convulsions를 일으킨다. Kojic acid는 누룩곰팡이菌의 一種인 Aspergillus albus MA18을 利用한 醱酵法에 따라 얻어진 物質로 白色-微黄色의 結晶性 가루로 물에 녹고 에탄올에 조금 녹으며 에틸, 클로르포름 또는 벤젠에 거의 녹지 않는다.<sup>5)</sup> 이들 成分의 分析方法은 각각 食品

Table 4. Recovery Rates of Spiked Kojic Acid in Cream. (Contain Kojic Acid)

	ADD(MG)	FOUND(MG)	RECOVERY RATE(%)
1	0.438	0.441	100.8
2	0.438	0.422	96.4
3	0.438	0.436	99.5
4	0.438	0.414	94.6
5	0.438	0.428	97.7
6	0.438	0.436	99.5
7	0.438	0.431	98.3
8	0.438	0.401	91.4
9	0.438	0.428	97.7
10	0.438	0.420	95.8
MEAN		0.426	97.2
SE		0.012	2.75
RSD		2.795	2.83



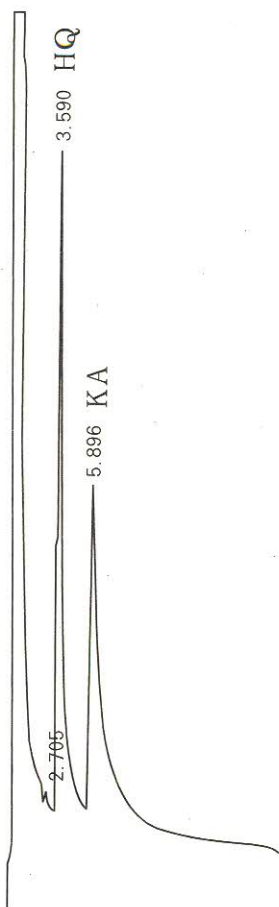


Fig. 4. GC Chromatogram of Hydroquinone(HQ) and Kojic acid(Ka) Standard.

醫藥品 安全本部告示,<sup>6,8)</sup> 美國藥典<sup>9)</sup> 등 各種公定書 및 이들 製품을 生産하는 製藥會社의 自家基準 및 試驗方法에는<sup>10)</sup> 따로 HPLC等을 利用하여 分析하게되어있다. 그러나 그 實驗 條件下에서는 두 成分의 peak가 겹쳐 同時分析이 不可能 하였다. 그리고 各各의 成分들을 HPLC等을 利用한 各種 試驗方法이 檢討된 文獻들은 있지만<sup>11-14)</sup> 두 成分을 同時에 分析한 예는 없었다. 그래서 著者等은 HPLC와 GC를 利用하여 두 成分을 同時 分析할수있는 分析方法을 摸索하였다. 實驗한 結果 GC의 境遇 HP-17, HP-20M, HP-5 등 여러 칼럼과 여러 溫度條件에서 分析方法을 檢討하였으나 同時分析이 不可能하였다.

단지 HP-1(Methyl silicone gum 10m\*0.53mm\*2.65 $\mu$ m)에서 hydroquinone이 3.6분에 kojic acid가 5.9분에 各各 檢出이되어 同時分析이 可能하였다. 그러나 GC

로 分析한 結果 재현성에대한 RSD가 hydroquinone의 경우 22.9% kojic acid의 경우 21.6%로 매우 再現성이 좋지않아 GC로는 定量에 쓰이지 못하고 成分의 同時 確認만 可能하였다. HPLC로 分析한 結果  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub> 에서는 두 成分의 分離가 完全하게 이루어지지 않았으며 8% 주석산 溶液등 公定書에 나온 溶媒보다는  $\mu$ -Bondapak phenyl Column에서 Table 1.의 條件下에서 HPLC로 分析한 結果 아주 良好한 結果를 얻었다. Kojic acid가 10.8분에 hydroquinone이 12.7분에 各各 檢出이되어 同時分析이 可能 하였고(Fig.3) HPLC에 의한 두 標準液의 檢量線은 Fig.2 과 같다. Kojic acid와 hydroquinone의 檢量線의 直線式은 前者가  $Y=7186.5X+74208$  後者가  $Y=4877X + 22165$ 이며 R값은 各各 0.99835 및 0.99911 로서 매우 相關성이 크므로 定量성이 높은것으로 나타났다.

檢出限界는 Kojic acid가 0.11 $\mu$ g/ml 이며 hydroquinone은 5.4 $\mu$ g/ml로 낮은 濃度에서도 檢出이 可能하였다. Hydroquinone이 含有되어있지 않고 kojic acid만 含有된 試料에 hydroquinone을 添加해 分析한 結果는 Table 3과 같다. 回收率은 96.5 $\pm$  2.35 %이었으며 RSD는 2.43으로 비교적 良好한 回收率을 나타냈다. 또한 kojic acid이 含有되어있지 않고 hydroquinone 만 含有된 試料에 kojic acid를 添加해 分析한 結果는 Table 4과 같다. 回收率은 97.2 $\pm$ 2.75%이 있었으며 RSD는 2.83으로 비교적 良好한 回收率을 나타냈다. 이들의 分析 chromatogram은 Fig.5와 같다.

이 分析方法을 가지고 kojic acid와 hydroquinone을 各各 含有한 試料의 含量을 檢査한 結果 hydroquinone을 含有한 3件의 試料는 表示量의 96.6-103.2%의 含量을 kojic acid를 含有한 3件의 試料는 80.7-99.1%의 含量을 나타냈다.(Table.5)

Table 5. Analytical Results of Kojic Acid and Hydroquinone in Bleaching Cream

Sample		Labeled amount(mg/g)	Contents of bleaching cream(%)
Kojic acid	1	10	80.7
	2	10	92.3
	3	30	99.1
Hydroquinone	1	20	96.6
	2	40	98.5
	3	40	103.2

實驗結果 kojic acid와 hydroquinone 두 成分을 同時에 分析할수있는 아주 良好한 結果를 얻었는데 이 두 成分

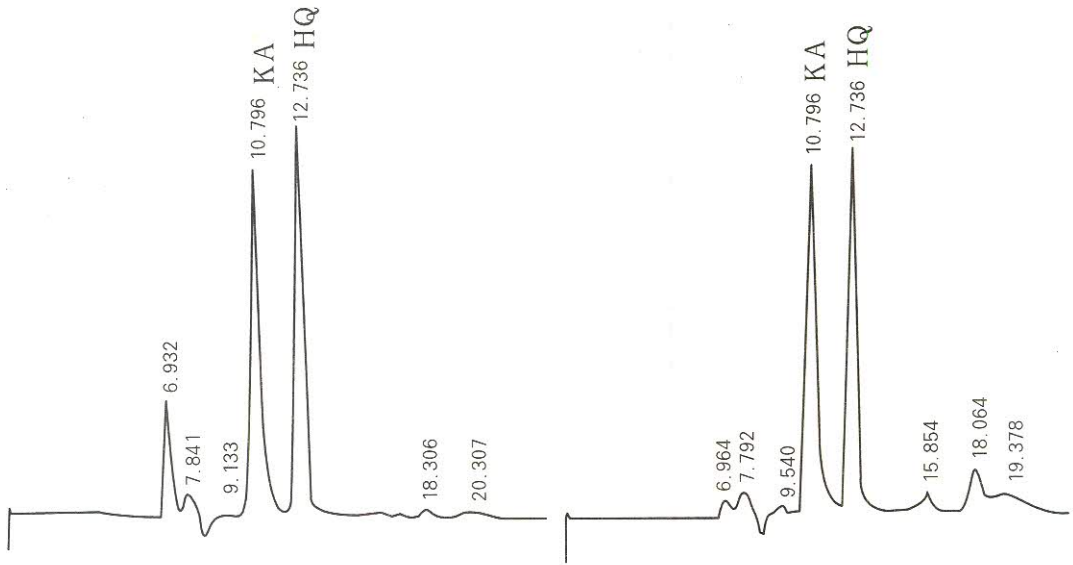


Fig. 3. HPLC Chromatogram of Hydroquinone(HQ) and Kojic acid(KA) Spiked Sample. (A:HQ spiked.Have not KA. B : KA spiked.Have not HQ)

뿐만 아니라 다른 類似한 成分에 대해서도 더욱 研究가 이루어져야 할것으로 思考된다.

### 結 論

크림劑에서 kojic acid와 hydroquinone을 同時 分析할 수있는 方法을 GC와 HPLC로 檢討한 結果는 다음과 같다.

#### [1] HPLC方法

1. Kojic acid와 hydroquinone 을  $\mu$ -Bondapak phenyl 칼럼을 使用 同時 分析하였다. 移動相은 Water:MeOH:Acetic acid(90: 7:3)이었으며 流速은 分當 0.4ml로 하여 UV254nm에서 測定 하였다.

2. 檢出限界는 kojic acid가 0.11 $\mu$ g/ml, hydroquinone이 5.4 $\mu$ g/ml 이었으며 retention time은 kojic acid가 10.8분에 hydroquinone이 12.7분 이었다.

3. 回收率은 各各 96.5 $\pm$ 2.35%(kojic acid)와 97.2 $\pm$ 2.75%(hydroquinone)이었다.

4. 再現性의 RSD는 kojic acid가 2.89% hydroquinone이 1.28%이었다.

#### [2] GC

1. Kojic acid와 hydroquinone 은 HP-1(Methyl silicone gum 10m\*0.53mm\*2.65 $\mu$ m) 칼럼에서 同時 分析하였다.

2. Retention time은 hydroquinone이 3.6분 kojic acid가 5.9분이었다.

3. 再現性의 RSD는 hydroquinone이 22.9% kojic acid가 21.6%로 再現性이 극히 떨어져 단지 定性에만 使用 可能 하였다.

### 參 考 文 獻

1. Alfred, G.G., Louis, S.G., Theodore, W.R. and Ferid, M.: The pharmacological basis of therapeutics, 7th,p955 (1985).
2. Cabanes, J., Chazarra, S. and Garcia-Carmona, F.: Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase.J. Pharm. Pharmacol. 46:982(1994).
3. Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P. E. : The Merck Index, Merck & Co., Inc..8th, p762(1989).
4. 환경청: 위해 화학물질 조사집,p380(1988).
5. Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A. and Heckelman, P. E. : The Merck Index, Merck & Co., Inc..8th, p5196(1989).

6. 식품의약품 안전본부: 의약품 기준 및 시험방법(I) 추보7, 식품의약품안전본부 고시 96-2호, p202(1992).
7. 식품의약품 안전본부: 의약품 기준 및 시험방법(I) 추보7, 식품의약품안전본부 고시 96-2호, p203(1992).
8. 식품의약품 안전본부: 의약품 기준 및 시험방법, 식품의약품안전본부고시 96-2호, p1987(1985).
9. U.S. Pharmacopeia 23, National Formulary 18, The United States Pharmacopoeial Convention Inc., p769(1995).
10. 구주제약 : 의약품 제조 품목신고서 제 278-6호(1994).
11. Hill, B.A., Kleiner, H.E., Ryan, E.A., Dulik, D.M., Monks, T. J. and Leu, S.S.: Identification of multi-s-substituted conjugates of hydroquinone HPLC-coulometric electrode array analysis and mass spectroscopy. *Chem. Res. Toxicol.* 6: 459 (1993).
12. Saito, T and Kojimaheria : Detection of hydroquinone in a poisoning case. *J. Forensic. Sci.* 39 : 266(1994).
13. Lee, B.L., Ong, H.Y., Shi, C. Y. and Ong, C.N. *J. Chromatogr.* 619: 259(1993).
14. Moffat, A.C., Jackson, J. V., Moss, M. S. and Widdop, B. : Clarke's Isolation and Identification of drugs in pharmaceuticals, body fluids and post-mortem material. The pharmaceutical press, London, p669(1986)