

# GC 및 HPLC 에 의한 화장품 중 Kojic acid 및 Hydroquinone 분석에 관한 연구

療品科

李貞美·鄭愛姬·高淑京·韓基榮·崔秉玄

## Determination of Kojic acid and Hydroquinone in Cosmetics by GC and HPLC

*Cosmetic division*

JeongMi Lee, AeHee Chung, SukKyung Ko, KiYoung Han and ByungHyun Choi

### Abstract

This study was carried out to determine Kojic Acid and Hydroquinone in imported cosmetics . Analytical subject were 7 kinds of creams and liquids which were collected in 1996.

The results were as follows:

1. Hydroquinone and Kojic Acid were completely seperated in 4 min. and 9 min. by GC HP-17 column , FID detector.
2. In HPLC -Bondapak C<sub>18</sub> column , Hydroquinone and Kojic Acid were seperated in 11 min. 14 min. by gradient . The reappearance of HPLC is much better than that of GC. it is possible to utilize in quantitative analysis.
3. In quantitative analysis of Kojic Acid, one of the samples was more than tolerance content, and the remains were 15% - 70%.
4. In analysis of specific ingradient , the component content of the samples was short of tolerance content.
5. As the above results, it is necessary to establish regulation system.

### 서론

예로부터 피부색을 하얗게 하는 것은 많은 여성들의 소망으로 일소에 의해 검어진 피부를 원래의 피부로 되돌리거나 기미, 주근깨등이 악화되는 것을 막을 목적으로 미백화

장품을 사용하고 있다.

이러한 미백효과가 있는 피부미백제로 하이드로퀴논, 코직산, 알부틴, 아스코르빈산, 태반추출물등이 알려져 있으며<sup>1,2)</sup> 현재에도 더욱 유효한 물질에 대한 활발한 연구가 진행되고 있다.

그중 하이드로퀴논(hydroquinone)은 티로신이 멜라닌

으로 대사되는 과정에 관여하는 티로시나아제의 작용을 억제해 멜라닌합성을 억제하며 또한 생성된 색소를 퇴화시키고 멜라닌 세포의 피사를 일으켜 멜라닌 색소의 피부침착을 막는 물질로 알려져 있다. 하지만 고농도로 피부적용시 홍반, 화상과 같은 접촉성 피부질환을 유발시켜 우리나라에서는 하이드로퀴논을 화장품 배합금지원료로 지정하여 관리하고 있으며 약용으로 판매되는 크림에는 5%미만으로 사용하도록 규제하고 있다.

코직산(Kojic acid, 5-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one)은 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 등의 사상균 발효액중에서 생산되는 항생물질<sup>3)</sup>로 멜라닌 생성의 원인이 되는 티로시나아제의 활성을 억제해 멜라닌을 환원시키는 효과<sup>4,5)</sup>로 피부를 희게 하여 화장품성분으로 널리 사용되고 있다.<sup>6,7)</sup> 일부 수입화장품중에 하이드로퀴논과 코직산의 혼용의 우려가 있어 이를 규명하기위한 방법으로 HPLC와 GC를 사용해 분리 정량하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 기기

GC는 Hewlett Packard사의 GC Model 5890과 3392A Intergrater, FID detector를 이용 하였고 HPLC는 Waters 의 515 pump, 486 Tunable Absorbance Detector를 사용 하였다.

### 2. 재료

표준품 으로 Kojic acid(Sigma CO.)와 Hydroquinone (Sigma CO.) 를 사용하였으며 표준품및 시료추출용매로 Ethanol(Hayman Limited, A.R. quality)를 사용하였다.

시료는 최근 1년간 본 연구원에 분석 의뢰된 수입 화장품 기초화장품 7종을 사용하였다

### 3. 실험방법

#### 1)표준액 조제

Kojic acid를 24.6mg취해 25ml용량플라스크에 넣고 ethanol로 표선까지 채워 stock solution으로 한다.

이 액을 각각 1ml, 3ml, 5ml씩 10ml용량플라스크에 넣고 ethanol로 표선을 채워 GC의 경우 1 $\mu$ l씩 HPLC의 경우 20 $\mu$ l씩 주입하여 검량선을 작성 하였다.

hydroquinone은 kojic acid와 구별하기 위하여 따로 표준액을 조제하였으며 23.1mg을 25ml의 용량플라스크에 넣고 ethanol로 채워 stock solution으로 한다. 이 액을

각각 취하여 위와 같은 방법으로 검량선을 작성 하였다.

#### 2)검액조제

코직산으로 300mg에 해당하는 검체량을 정확히 취하여 100ml용량 플라스크에 넣고 ethanol을 가한후 35 $^{\circ}$ C에서 30분간 ultrasonication시킨다. 그후 5B여자로 여과 하고 Sep pak C<sub>18</sub>로 여과한 후 검액으로 사용하였다. (Fig. 1)

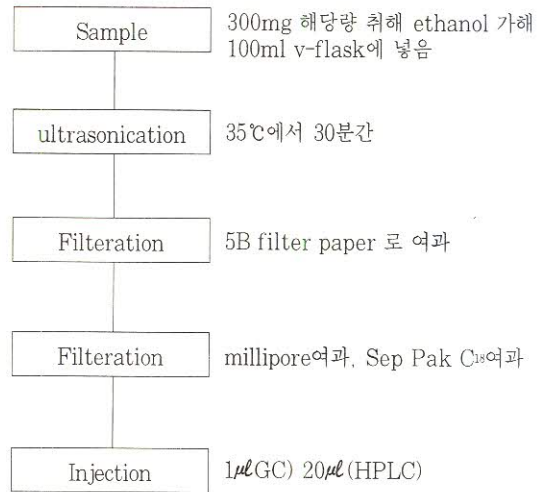


Fig. 1. Scheme of Extraction Method.

Table 1. Analytical Condition of Gas Chromatography

Instrument	GC Model 5890 (Hewelett Packard)
Column	HP-17(10 m x 0.53mm x 2.65 $\mu$ m)
Detector	FID
Column Temperature	
Initial	110 $^{\circ}$ C for 2min.
Rate	5 $^{\circ}$ C /min.
Final	140 $^{\circ}$ C for 5min.
Injector Temperature	150 $^{\circ}$ C
Detector Temperature	180 $^{\circ}$ C
N2 Flow	2.9ml/min.
Injection Volume	1 $\mu$ l

Table 2. Analytical Condition of HPLC

Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>
Detector	Waters 486 Tunable Absorbance detector
Pump	515 Pump
Frow Rate	0.5ml/min.
Injection Volume	20 $\mu$ l
Mobile Phase	8% MeOH with 3% HAc Soln.
Chart speed	0.25cm/ min.

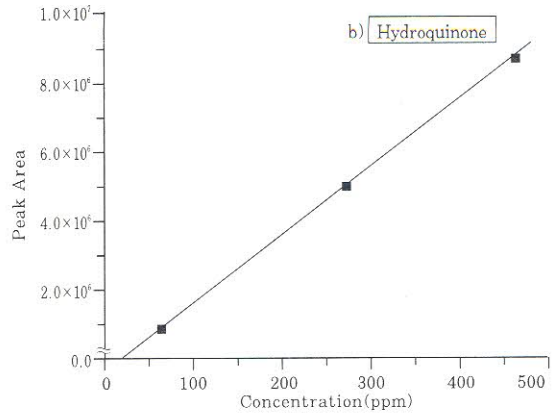
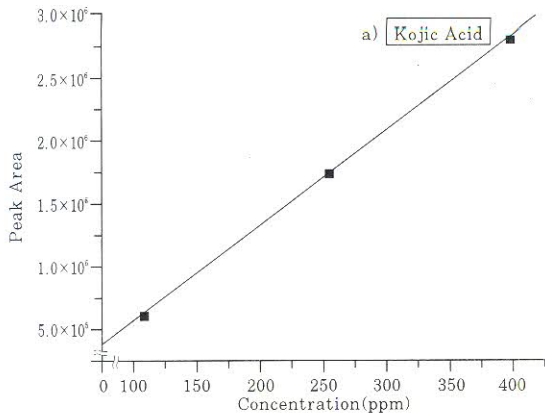


Fig. 2. Standard Calibration Curve of Kojic Acid and Hydroquinone by GC

### 3) 실험조건

실험조건은 Table 1., Table 2. 와 같다.

### 실험결과 및 고찰

GC분석에서 kojic acid 표준원액을 희석하여 얻은 검량

선은 Fig.2 a)에서 보는 것과 같이 양호한 직선을 나타내었으며 회귀 직선식은 Table 3과 같으며 표준액의 상관계수 ( $r$ )은 0.9751으로 양호한 직선을 나타 내었다.

hydroquinone의 검량선은 Fig.2 b)와 같으며 회귀직선식은 Table 3 에서 보는것과 같이 ( $r$ ) 값은 0.9986로 양호한 직선관계를 나타 내었다.

본 실험에서는 GC분석에서 먼저 HP-20M column을 이용 하였으나 분리가 안되어 다시 HP-17 column을 이용 하였는바 110℃ 에서 5℃씩 상승시켜 140℃까지 승온분석 하였을시 각각 hydroquinone은 4분대 kojic acid는 9분

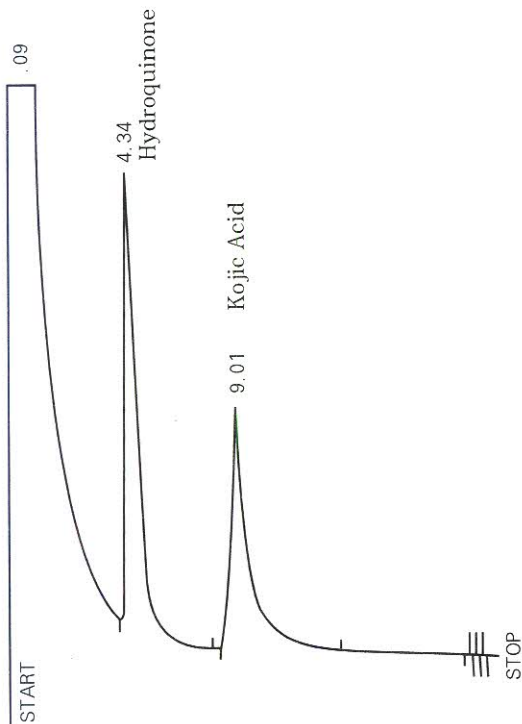


Fig. 3. GC Chromatogram of mixed Standard Solution

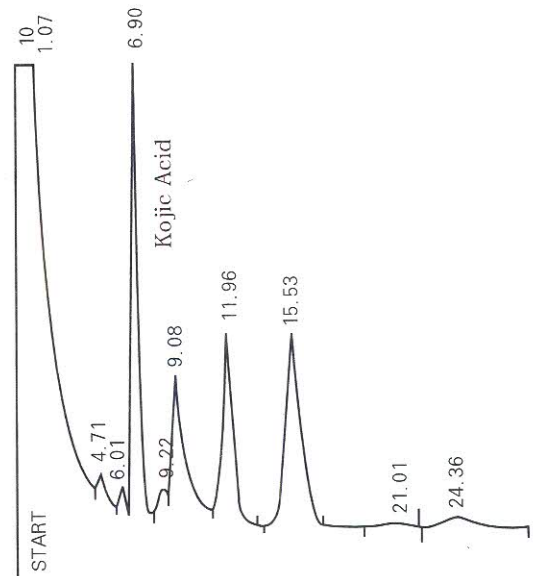
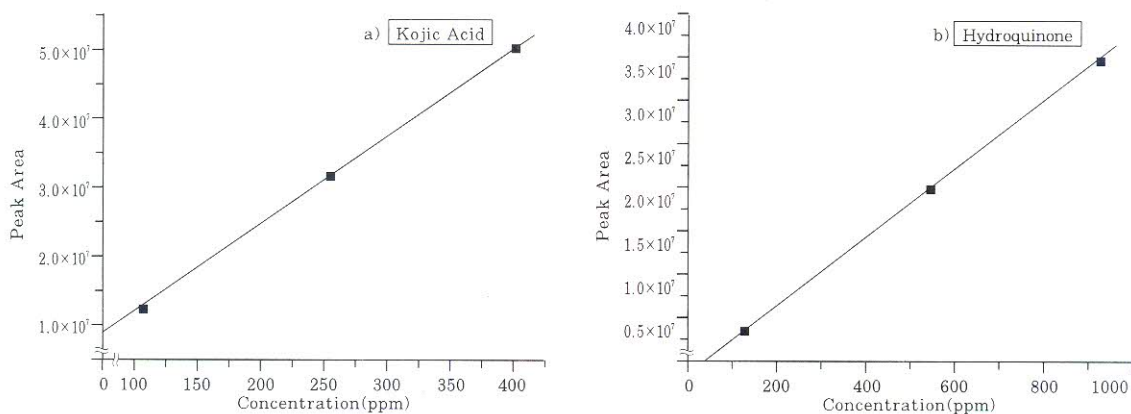


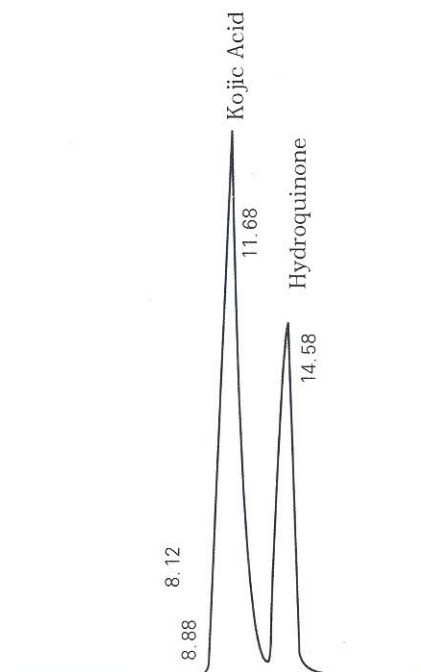
Fig. 4. GC Chromatogram of Sample Solution

**Table 3.** Correlation Coefficient and Linear Regression of Kojic Acid (KA) and Hydroquinone (HQ) by HPLC and GC

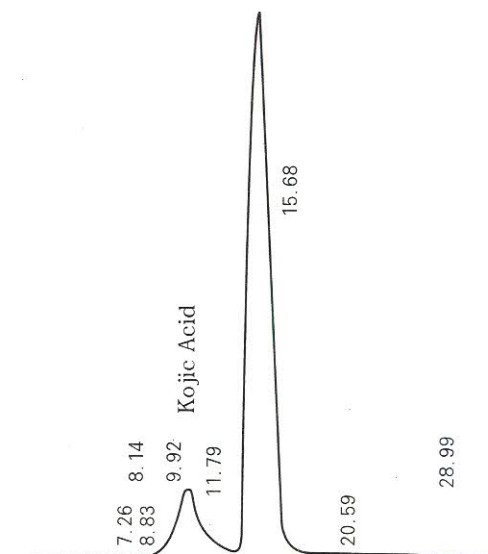
Instrument	Component	Correlation Coefficient	Linear Regression
HPLC	KA	0.95285	$Y = 66548X + 1.4 \times 10^7$
	HQ	0.99995	$Y = 39418X + 1.7 \times 10^5$
GC	KA	0.97496	$Y = 5184 X + 6.1 \times 10^5$
	HQ	0.99854	$Y = 18407X - 2.0 \times 10^5$



**Fig. 5.** Standard Calibration Curve of Kojic Acid and Hydroquinone by HPLC



**Fig. 6.** HPLC Chromatogram of mixed Standard Solution



**Fig. 7.** HPLC Chromatogram Sample Solution

**Table 4.** Recovery of Kojic Acid (KA) and Hydroquinone (HQ) by GC

Sample	KA		HQ	
	Add(mg)	Found(mg)	Add(mg)	Found(mg)
1	10.0	8.74	10.0	9.96
2	10.0	8.61	10.0	9.89
3	10.0	9.32	10.0	9.23
4	10.0	8.99	10.0	9.45
5	10.0	8.21	10.0	9.95
6	10.0	9.10	10.0	9.65
7	10.0	8.46	10.0	9.87
recovery rate (%)				
(mean S.D.)		87.8±2.0	97.1±0.6	

대에서 분석이 가능하였다. standard 및 sample의 GC chromatogram은 Fig. 3, Fig. 4와 같다.

GC에 의한 kojic acid의 시료로부터의 회수율은 Table 4와 같이 재현성이 좋게 나타났고 kojic acid 및 hydroquinone의 분리가 명확히 되어 hydroquinone의 검체에의 포함 여부를 분석해낼 수 있어 정성확인이 가능하였다. HPLC에 의한 kojic acid 및 hydroquinone의 검량선은 Fig. 5의 a), b)와 같고 kojic acid는 11분, hydroquinone 14분 (Fig. 6, Fig. 7)에서 검출되어 동시 분석이 가능하였으며 상관계수는 kojic acid는 r값이 0.9529, hydroquinone은 0.9999로 kojic acid보다 hydroquinone이 더 양호한 직선성을 나타냈음을 알 수 있고 매우 상관성이 크게 나타났다. (Table 3) 회수율은 Table 5와 같다.

회수를 측정시 GC는 10mg을 HPLC는 2mg을 사용한 이유는 GC의 경우 감도가 낮기 때문에 더 많은양을 사용하였다. 1개의 시료에 hydroquinone이 들어있음이 의심되어 Fig 8, 9에서 보는 것과 같이 GC mass로 분석해본 결과 시료 5번에서 나온 4.06분대의 피크를 library match시켜보니 hydroquinone임을 알 수 있어 이 시료에 hydroquinone이 들어있음을 확인 할 수 있었다.

위의 분석법으로 크림 및 액상제품중에서 kojic acid의 함량을 분석해 본 결과는 Table 6과 같으며 정량한 결과

**Table 5.** Recovery of Kojic Acid (KA) and Hydroquinone (HQ) by HPLC

Sample	KA		HQ	
	Add(mg)	Found(mg)	Add(mg)	Found(mg)
1	2.0	1.947	4.0	3.947
2	2.0	1.920	4.0	3.982
3	2.0	1.970	4.0	3.997
4	2.0	1.952	4.0	3.914
5	2.0	1.941	4.0	3.967
6	2.0	1.992	4.0	3.970
7	2.0	1.927	4.0	3.966
recovery rate (%)				
(mean S.D.)		96.85±0.71	98.91±0.34	

kojic acid의 양이 기준치 이하임을 알게 되었다.

또한 크림류에 kojic acid 대신 더 작용이 크며 배합금지 성분인 hydroquinone 들어 있는지 검사하여 본 결과 hydroquinone이 포함된 검체가 1건이 발견되어 각 성분 에 대한 품질관리가 매우 필요함을 알 수 있었다.

결론적으로 GC 및 HPLC에 의한 kojic acid 및 hydroquinone의 동시분석이 가능하였으며 제조증명상의 원료성분 함량 표시와 실제검체의 성분이나 함량이 차이가 나므로 특수효과를 나타내는 성분에 대한 품질관리를 위한 엄격한 기준설정과 이외에 호르몬제 등의 화장품으로의 유입 등을 포괄하여 규제할 수 있는 제도가 필요하다고 사료되며 kojic acid를 포함한 여러 특수성분 들의 성분분석 방법 역시 더욱 연구되어져야 할 것이다.

## 결 론

수입화장품 크림 및 리퀴드류중 kojic acid를 GC 및 HPLC를 이용해서 분리 확인하고 이를 실제 검정에 이용하고자 연구 하여본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GC의 HP-17 column, FID 검출기를 이용하여 분석한 결과 hydroquinone은 4분대 kojic acid는 9분대에서 동시 분석이 가능 하였다.
2. HPLC를 이용  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>에서 시료를 분석

**Table 6.** Analytical Results of Kojic Acid (KA) and Hydroquinone (HQ) by HPLC

Sample	Labeled amount(%)	Kojic Acid Analytical concentration(ppm)	Actual amount(%)
1	3	N.D.	N.D.
2	1	14247	142.5
3	3	4498	15.0
4	3	19824	66.1
5	3	14011	46.7
6	1	6023	60.2
7	3	16389	54.6

한 결과 11분 과 14분 대에서 동시분석이 가능 하였으며 재현성이 양호해 정량에 이용이 가능하였다.

3. 정량시 각 검체의 함량은 kojic acid 에서 1건은 기준량 이상 이었지만 대개 15% - 70% 로 다양한 분포를 보였고 1건은 검출되지 않았으며 금지 성분인 hydroquinone이 포함된 검체도 1건 있었다.

4. 시료중 특수 성분의 분석시 성분함량이 미달되는 제품도 있어 함량 기준및 규제에 관한 제도적 장치가 필요함을 알 수 있다.

### 참 고 문 헌

1. 田村健夫 廣田 博 : 化粧品科學-理論と實際-, 第2版, フレ

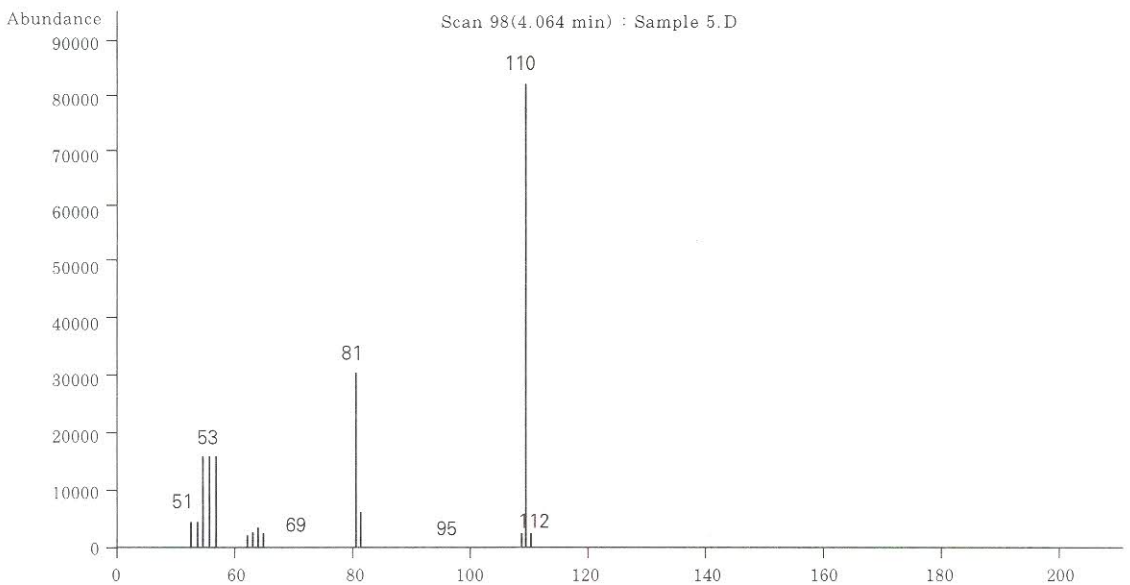
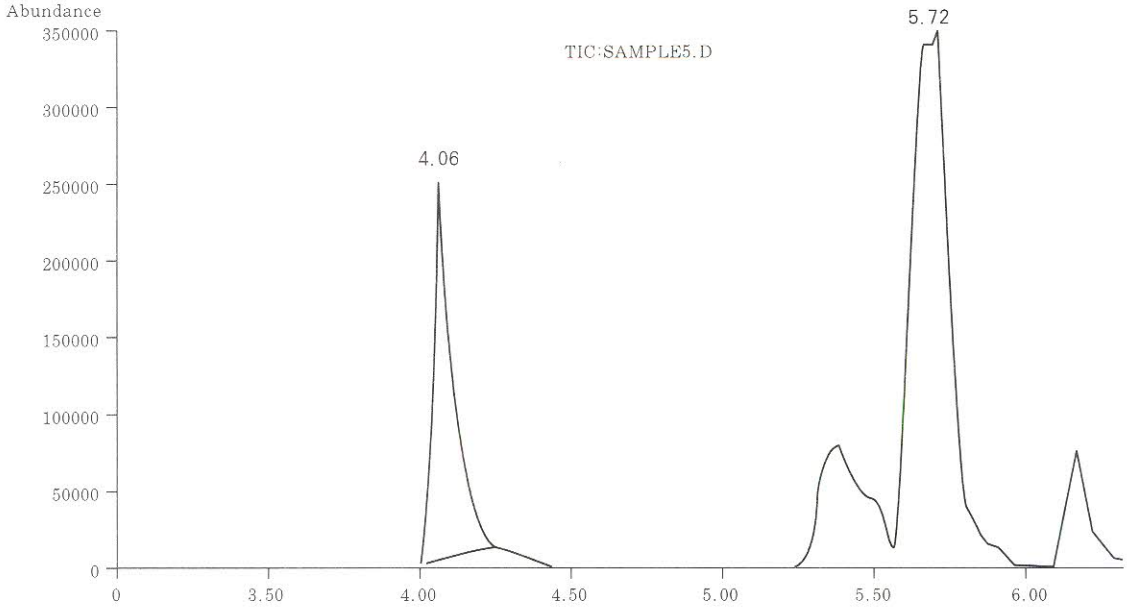


Fig. 8. GC Mass Chromatogram of Sample NO.5 Solution

- ウランシヤナル社, p258-260(1994)
2. 김연주편저 : 화장품학, 청구문화사 p20-21(1995)
  3. Kwak, M. Y., Rhee, J. S. Cultivation characteristics of immobilized *Aspergillus oryzae* for kojic acid production. *Biotechnol. Biong.* 39:p903-906(1992)
  4. Saruno, R., Kato, F., Ikeno, T. Kojic acid, a tyrosinase inhibitor from *Aspergillus albus*. *Agric. Biol. chem.* 43:p1337-1339(1979)
  5. 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:p982(1994)
6. Obara, Y., Ito, T., Hizu, Y. Cosmetic skin whitening by food containing kojic acid and its esters. In: *Jpn. Kokai Tokyo Koho J.P.* 60:p137-253(1985)
  7. Ohshima, Y. Melanogenesis-inhibitory effect of kojic acid and its action mechanism. *Fragrance J.* 6:p53-58 (1990)

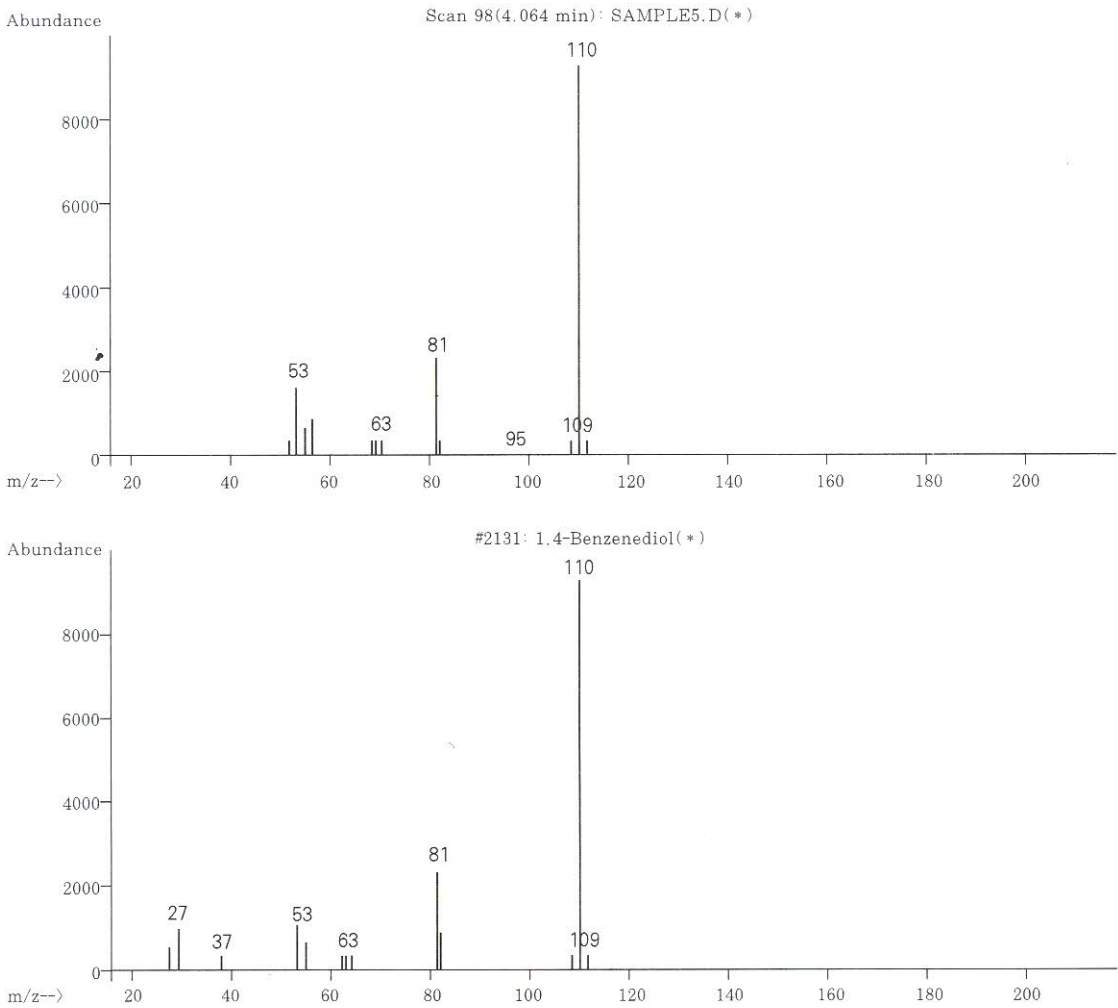


Fig. 9. Library Match of Hydroquinone of Sample NO.5 Solution