

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫成果報告

開發簡單快速之分析方法 同時測定化妝品中美白及除皺成份

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫
計畫編號：NSC 89 - 2626 - E - 041 - 004 -
執行期間：89 年 8 月 1 日 至 90 年 7 月 31 日

計畫主持人：張 妙 玲
共同主持人：陳 榮 秀

本成果報告包括以下應繳交之附件：

- 赴國外出差或研習心得報告一份
- 赴大陸地區出差或研習心得報告一份
- 出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份
- 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

執行單位：嘉南藥理科技大學

中 華 民 國 90 年 10 月 20 日

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

國科會專題研究計畫成果報告撰寫格式說明

Preparation of NSC Project Reports

計畫編號：NSC 89-2626-E-041-004

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：張妙玲 執行機構及單位名稱：嘉南藥理科技大學

共同主持人：陳榮秀 執行機構及單位名稱：嘉南藥理科技大學

計畫參與人員：xxxxxx 執行機構及單位名稱

一、中文摘要

甘醇酸(I, Glycolic acid), 抗壞血酸(II, Ascorbic acid), 熊果甘(III, Arbutin) 及維他命 C 磷酸鎂鹽(IV, Mg Ascorbyl phosphate) 均是屬於親水性的美白除皺成份(Hydrophilic chemical peelings), 在臨床上常以單一或混合兩種以上之美白除皺成份治療角質問題與光老化受傷之問題皮膚。由於它們具有刺激性與毒性, 在化妝品中, 常被有限量地添加在美白除皺產品中。本研究利用 RP HPLC 分析以 ion pairing agent buffer 為沖流液及 UV 220nm 之條件同時測定以上四種成份。此四種成份 (compounds I~IV) 檢量線(calibration curve) 的線性範圍分別為: compounds II, III 是 $0.01\sim 1\text{mg ml}^{-1}$, compound I 是 $1.5\sim 75\text{ mg ml}^{-1}$, compounds IV 是 $0.02\sim 2.4\text{mg ml}^{-1}$, 相對係數(correlation coefficient) 的範圍從 0.9971~0.9999。此分析方法的精確度以 RSD % (n=5) 表示, 範圍從 1.29 % ~1.88 % , 另在實際樣品中回復率的範圍從 97.2 % ~106.2 % 。

關鍵詞：化妝品、化學剝離劑、甘醇酸、抗壞血酸、

熊果甘、維他命 C 鎂鹽

Abstract

A high-performance liquid chromatographic method for quantifying four of the most common hydrophilic chemical peelings - glycolic acid(I), ascorbic acid(II), arbutin(III) and Mg ascorbyl phosphate(IV), has been developed. Isocratic separation was performed using an C_{18} column with ion pair agent as mobile phase. The analytes were detected by ultraviolet light absorption at the wavelength of 220nm and 240nm, respectively. Calibration curves were found to be linear in the $0.75\sim 75\text{mg ml}^{-1}$ (compound I), $0.01\sim 1\text{mg ml}^{-1}$ (compound II and IV), and $0.02\sim 2.4\text{mg ml}^{-1}$ (compound IV). The correlation coefficient of linear regression analysis were with the range 0.9971~0.9999. The precision of this method, calculated as relative standard deviation(RSD, n=5), was better than 2 % for all compounds I~IV. The procedure is rapid, simple, selective and it is suitable for routine analyses of commercial cosmetics.

Keywords: cosmetic product ; chemical

peelings ; Glycolic acid ; Ascorbic acid ; Arbutin ; Mg Ascorbyl phosphate ; HPLC

二、緣由與目的

許多 chemical peelings 如維他命 A 酸 (Vitamin A acid) , 麴酸 (Kojic acid) , 壬二酸 (Azelaic acid) , 甘醇酸 (Glycolic acid) , 對苯二酚 (Hydro-quinone) , 水楊酸 (Salicylic acid) , 維他命 C (Ascorbic acid) , 維他命 C 磷酸鎂鹽 (Mg Ascorbyl phosphate) , 熊果甘 (Arbutin) 等, 在臨床上常用來當化學治療劑 (chemotherapeutic agent) 處理角質問題及光老化受傷 (photodamaged) 之皮膚 [1-5] , 在國內, 其中有某些成份被限量的使用在化妝品中當作美白除皺 (Depigmenting and antiwrinkle) 之成份, 如維他命 C 磷酸鎂鹽, 維他命 C 醣體, 熊果甘及麴酸, 其容許限量分別為 3 % , 2 % , 2 % , 7 % 。化妝品中這些成份之定量有些已被發表 [6~13] , 有些則尚未有任何分析方法被發表。本研究選擇常被使用在化妝品中的 Hydrophilic chemical peelings - 甘醇酸, 維他命 C、維他命 C 磷酸鎂鹽及熊果甘進行同時測定之分析方法的探討。由於維他命 C 是一不安定的成份, 很容易受空氣氧化成 DHA (11~12) , 進而影響分析的準確度。因此本實驗探討各種不同抑制維他命 C 氧化的條件。經由一系列探討結果顯示, 利用氮氣去氧法是最為簡便, 效果最好, 且能維持最長的穩定時間。另由於親水性之成份極性相當大以 C-18 column 在一般甲醇/水

及乙氰/水的系統中分析, 常快速的被沖流出來, 而無法達到有效地分離, 目前我們配製 ion pairing agent (Tetrabutyl ammonium hydroxide) 的緩衝溶液, 進行此四種成份的分離, 並將此分析方法應用到乳化製品的分析, 得到極佳的線性關係與精確度。另以實際樣品的回復率測試, 結果顯示本分析方法有極滿意的可信度, 最後亦將本方法應用到 real sample 的分析。

三. 結果與討論

1. 分離條件探討 :

首先本實驗利用 C-18 管柱在不同特性的沖提液下分離四種極性大的成份, 其結果如圖(一)所示。圖(一)之(a)只有熊果甘成份為單一分離波峰 (RT=5.22 min) , 其他成份全部重疊在一起, 圖(一)之所以(b)及(c)是改變 TBAH 緩衝溶液的濃度, 察對成份滯留時間的影響, 從分析圖譜得, 佑緩衝溶液中 TBAH 的濃度變化對成份 I ~ III 的滯留時間沒影響, 但對成份 IV 則影響很大, 大從 RT=40.2 min 改變至 RT=29.0 min。因此選擇圖(一)之(c)之沖流液為分離條件。另分別在 220nm 及 240nm 進行成份物之感度測試分別得如圖(二)之(a)及(b), 在 240nm 偵測分析時, 維他命 C 及維他命 C 鎂鹽之感度與 220nm 相較改變不多, 甘醇酸及熊果甘之總度較 220nm 降低許多, 因此選擇 220nm 為同時測定的偵測條件。

2. 干擾物的分析 :

對於干擾物的分析將成份 I~IV 與常添加在乳液中的其他水相成份混合進行干擾物的分析, 其層析圖如圖(三) , 將各種成份之滯留時間列如表(一)。從圖(二)及表(一)得知 U13 成份 (RT=2.7min) 會干擾甘醇酸 (RT=2.93min) 的分析, 但也由

此可知乳化製品是否有添加 U13 ,若沒有添加 U13 ,則可以順利地同時分析成份 I~IV。

3. 維他命 C 之安定性探討:

由於維他命 C 是一不安定性物質,易受空氣中的氧氣化,分析時以即時配製即時分析進行,準確度不好且方便性不佳。因此本驗也探討一系列可安定維他命 C 的條件。配製 100ppm 維他命 C 在不同的條件下測定成份濃度對時間的變化,結果如圖(四)至圖(七)所示。圖(四)顯示在純水室溫(25)條件中,維他命 C 約 30min,成份濃度就以開始衰減,但若在緩衝溶液(pH=2)並冷藏(8)條件下,則可提高至 300min 的安定性圖(五)及圖(六)則分別在不同濃度的 BHT 及 BHA 發現在 100ppmBHT 變化到 2000ppm 時,維他命 C 的安定時間從約 240min 提高到約 500min,在 100ppmBHA 變化到 2000ppm 時,維他命 C 的安定時間從約 250min 提高到約 300min,因此可知 BHT 的安定效果稍大於 BHA 的條件。圖(七)是在純水中以氮氣去氧法比較室溫(25)及冷藏(8)之條件,對維他命 C 的安定影響,結果顯示冷藏之安定(約 4500min)較室溫(約 3500min)好,所以選擇氮氣去氧法為安定維他命 C 的定量分析方法。

4. 檢量線的測定

分析的精確度與準確度測定。成份 I~IV的線性範圍如表(二)所示,相對係數

(Correlation coefficient) 從 0.9971~0.9999,相對標準偏差(RSD%,n=5)從 1.29%~1.88%。

5. 回復率及市售產品之測定

應用此一方法分析在實際乳霜樣品中的各個成份的回復率如表(三)所示,範圍從 97.2%~106.2%。應用在市售美白防皺化妝品產品的分析如表(四)所示,目前國內市售產品仍多偏向單一美白成份的添加。含量則符合標示所示。

四.計劃成果自評

今年度本計劃已順利完成以 HPLC 儀器同時測定四種親水性美白成份之研究,目前正進行英文論文之撰寫,擬投稿國外期刊。另對於親油性之美白成份與美白成份在化妝品產品中之安定性研究也正在實驗進中,期能繼續假獲得國科會的支持,使一系列美白成份之研究更為完整。

五.參考文獻

- 1.Cotellessa,C.,Peris,K.,Onorati,M.T.,Fargnoli,,M.C.,Chimenti,S., "The Use of Chemical Peelings in the Treatment of Different Cutaneous Hyperpigmentations" ,*DFIMATOLOGIC SURCIERY*,25(1999),pp450-454
- 2.Picard,G.E.,Kligman,A.M.,Stoudemaryer,T.,Leveque,J.L., "Comparative Effects of Retinoic Acid,Glycolic Acid and a Lipophilicb Derivative of Salicylic-Acidon Photodamaged Epidermis" ,*DERMATOLOGY*,199(1999),

pp50-53

3. Gupta, M.A., Gupta, A.K., "Photodamaged Skin and Quality-of-Life-Reasons for Therapy" , JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT, (1996) pp261-264
4. Griffiths, C.E.M., "Treatment Options for Photodamaged Skin" SKIN PHARMACOLOGY, 10(1997), pp1-11
5. Kligman-LH, Crosby-MJ, Kligman-AML, "An Animal-Model for Assessing the Effects of Chemical Peels on Photoaged Skin" , JOURNAL OF DERMATOLOGICAL TREATMENT, 10(1999), pp37-45
6. Appa, Y., "Retinoid Therapy-Compatible Skin Care" SKIN PHARMACOLOGY AND APPLIED
7. Shih, Y., Zcn, J.M., "Voltammetric Determination of Kojic Acid in Cosmetic" , ELECTROANALYSIS, 11(1999), pp229-233
8. Firth, J., Rix, I., "Determination of Hydroquinone in Skin-Toning Creams Using High-Performance Liquid-Chromatography" , ANALYST, 111(1986), pp129-132
9. Scalia, S., Callegari, R., Villani, S., "Determination of Glycolic Acid in Cosmetic Products by Solid-Phase Extraction and Reversed-Phase Ion-Pair High-Performance Liquid-Chromatography" , JOURNAL OF

CHROMATOGRAPHY

- A, 795(1998), pp219-225
10. Scalia, S., Bianchi, A., Villani, S., Guarneri, M., "Assay of Underivatized Azelaic Acid in Pharmaceutical and Cosmetic Products by HPLC" , PHARMAZIE(1997), pp929
11. Enzo Sottofattori, Maria Anzaldi, Alessandro Balbi, Giuseppe Tonello, "Simultaneous HPLC determination of multiple components in a commercial cosmetic cream" , JOURNAL of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 18(1998) 213-217
12. Golubkina-NA, "Vitamin-C Determination in Food-Products" , JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY OF THE USSR, 44(1989), pp1091-1100
13. Ziegler-SJ, Meier-B, Sticher-O, "Fast and Selective Assay of 1-Ascorbic Acid in Rose Hips by RP-HPLC Coupled with Electrochemical and/or Spectrophotometric Detection" , PLANTA MEDICA, (1986), pp383-387
14. Volotovskiy-V, Kin-N, ANALYTICA ACTA, 359(1998), pp143-148
15. Cheregi-M, Danit-AF, ANALYTICAL LITERS, 30(1997), pp2625-2640

Table — interference of others component

Compound	Retention Time (min)
u-13 ^a	2.706
Glycolic acid ^b	2.929
Ascorbic acid ^c	4.183
Arbutin ^d	5.929
Citric acid ^e	8.509
EDTA ^f	n.d.
Methyl paraben ^g	n.d.
Sorbital ^h	n.d.
Magnisium ascorbyl phosphate ⁱ	27.111

- } 備註: 各成份物之濃度依序分別為
 } a: 400ppm, b: 5933ppm, c: 467ppm, d: 433ppm, e: 2667ppm,
 } f: 267ppm, g: 267ppm, h: 567ppm, i: 267ppm
 } n.d not detected

表二 Validation data(n=6)

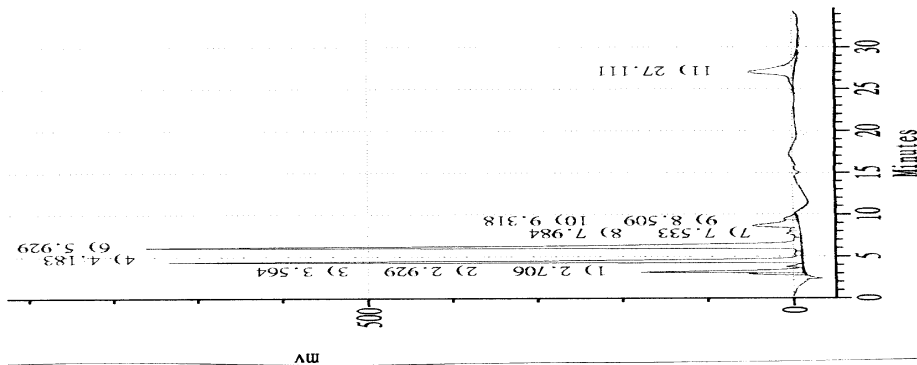
Comp.	conc. range	Calibration curves	corr. Coeff(r)	RSD%
I	0.75~75 mg ml ⁻¹	$Y = 2.6979 \times 10^2 x + 6.1985 \times 10^3$	0.9999	1.62%
II	0.01~1 mg ml ⁻¹	$Y = 1.7652 \times 10^4 x + 4.5644 \times 10^5$	0.9971	1.75%
III	0.01~1 mg ml ⁻¹	$Y = 1.9693 \times 10^4 x + 3.8463 \times 10^5$	0.9999	1.29%
IV	0.022~2.4 mg ml ⁻¹	$Y = 1.3697 \times 10^4 x + 1.2848 \times 10^6$	0.9987	1.88%

表三 Recoveries of compound I~IV Added to cosmetic formulations

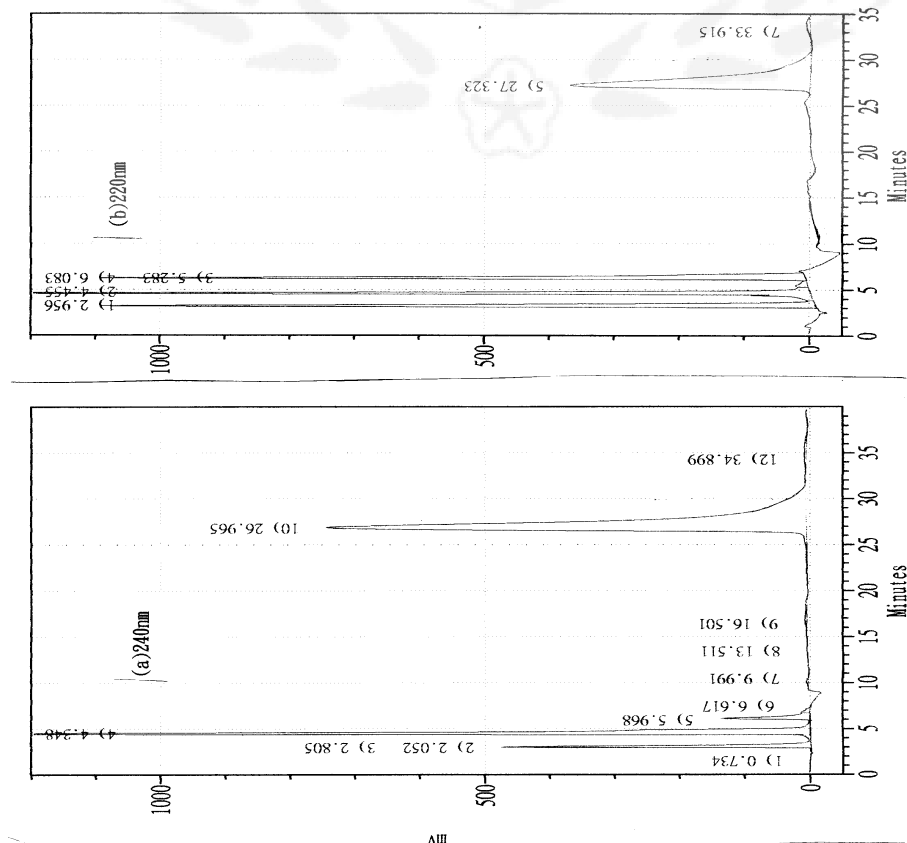
Compound	I	II	III	IV
Amount added	220mg	10.1mg	20.1mg	20.4mg
1	103.6	106.9	98.0	101.5
2	101.4	104.0	97.0	102.9
3	103.6	107.9	96.5	102.0
Mean	102.9	106.2	97.2	102.1
SD	1.27	2.0	0.76	0.75
RSD	1.23 %	1.88 %	0.78 %	0.73 %

表四 Analysis of commercial whitening products

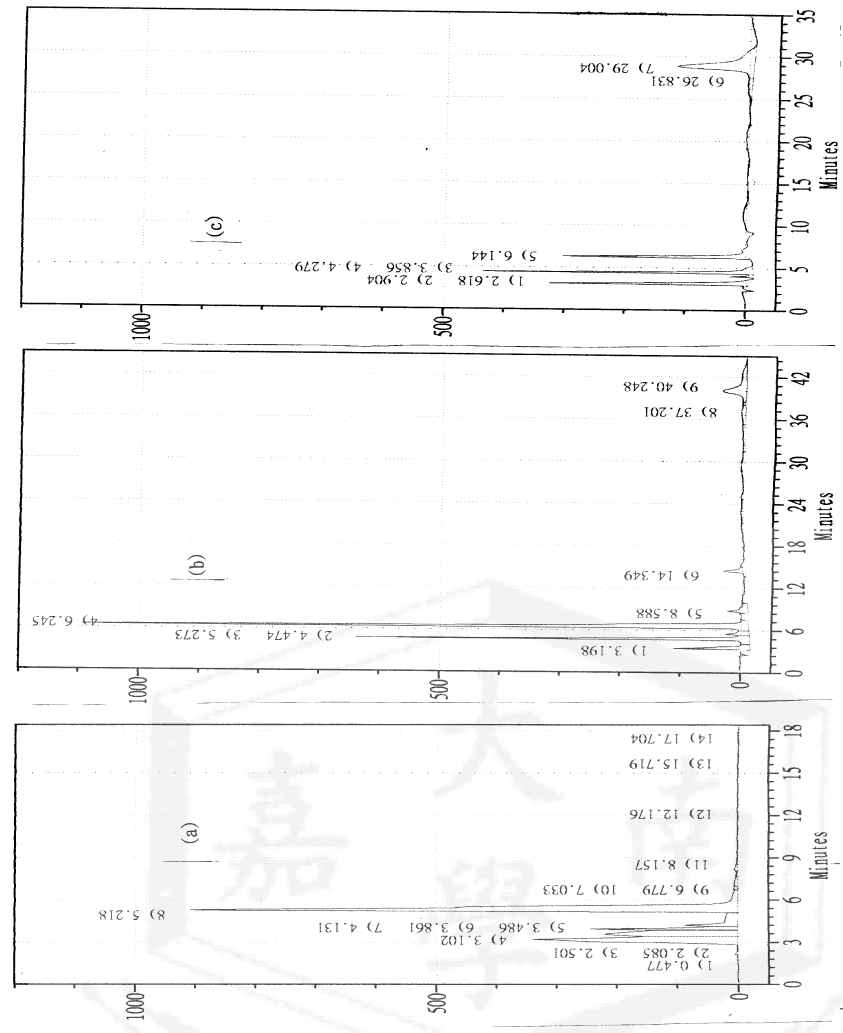
Sample	Amount labeled	Amount found (%, w/v)
Whitening gel		
I	-	-
II	-	-
III	-	-
IV	1.5%	1.56%
Whitening powder		
I	1.0%	1.08%
II	-	-
III	-	-
IV	0.5%	0.47%
Whitening cream		



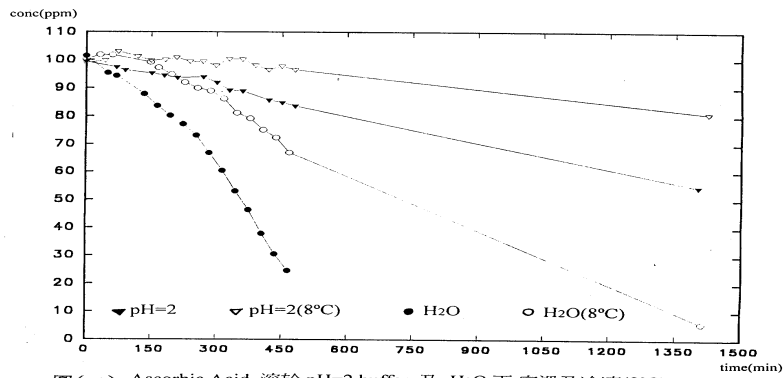
圖(三)乳液與其他水相成份與成份I~IV混合後,以沖流液 Buffer(2) 流速 1.1ml/min, UV220nm 分析之層析圖



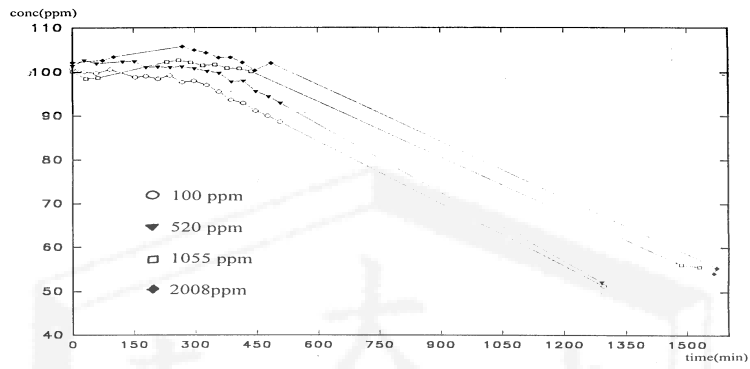
圖(二)在沖流液為 Buffer(2)流速 1.1ml/min, 改變波長條件下, 成份 I-IV 之層析圖 (a) 240nm (b) 220nm



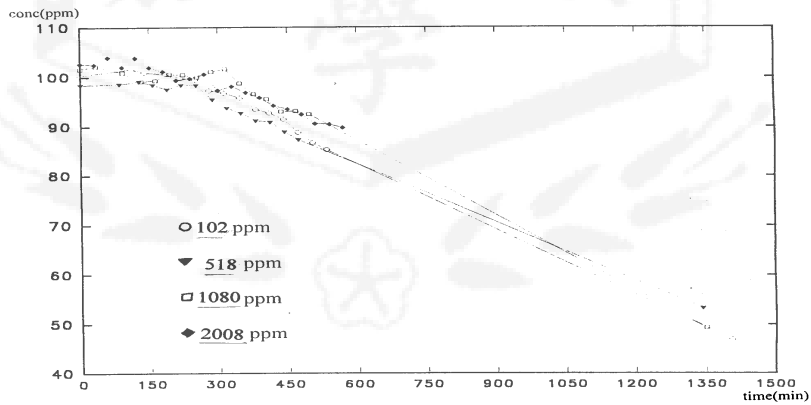
圖(一)在不同沖流液, 流速 1.0ml/min, UV220nm 條件下, 成份 I-IV 之層析圖 (a) 沖流液為 AN/H₂O(0.5MmH₂PO₄)=5/95, (b) 沖流液為 Buffer(1) 20mM TBAH+2.4mM EDTA+30mM KH₂PO₄+35mM H₂PO₄, (c) 沖流液為 Buffer(2) 40mM TBAH+2.4mM EDTA+30mM KH₂PO₄+35mM H₂PO₄



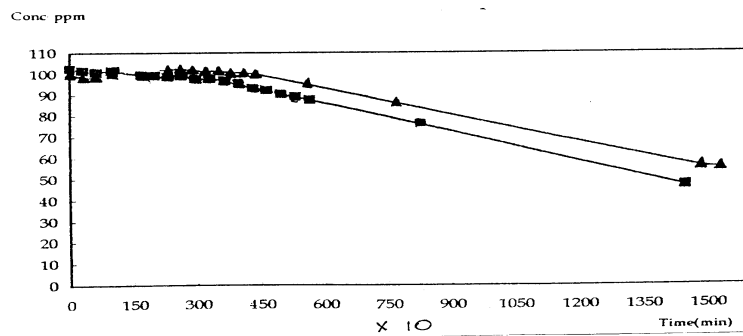
圖(四) Ascorbic Acid 溶於 pH=2 buffer 及 H₂O 下,室溫及冷凍(8°C) 長時間下之濃度變化結果(時間對濃度作圖)



圖(五) Ascorbic Acid 溶於 100,520,1055,2008ppmBHT 溶劑長時間 下之濃度變化結果(時間對濃度作圖)



圖(六) Ascorbic Acid 在 102,518,1080,2008ppmBHA 溶劑長時間下 之濃度變化結果(時間對濃度作圖)



圖(七) : Ascorbic acid 以氮氣去法在室溫(25°C)及冷藏(8°C) 條件下之濃度變化結果

