

Deri Beyazlatıcı Kozmetiklerdeki Kojik Asit ve Arbutin'in Tanımlanması ve Kantitatif Analizi¹

IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE ANALYSIS OF KOJIC ACID AND ARBUTINE IN SKIN-WHITENING COSMETICS

M.-O. MASSE*, V. DUVALLET*, M. BORREMANNS*, L. GOEYENS*

*Ministère des Affaires Sociales, de la Santé Publique et de l'Environnement, Institut Scientifique de Santé Publique, Section Produits de Consommation, Rue Juliette Wytsman 14, 1050 Bruxelles, Belgium

© Masse M-O, Duvallet V, Borremans M, Goeyens L. Identification and Quantitative Analysis of Kojic Acid and Arbutine in Skin-Whitening Cosmetics. *International Journal of Cosmetic Science*, 2001; 23(4):219-232.

Özet

Literatürde tanımlanan birçok kromatografik sistemlerin denenmesinden sonra, deri-beyazlatıcı kozmetik ürünlerdeki kojik asit (CAS RN 501-30-4) veya arbutine'in (CAS RN 497-76-7) ayırımı, tanımlanması ve dozajı için TLC ve HPLC/UV'nin gruplandırılmasında basit ve hızlı bir metod geliştirmek için optimal şartlar oluşturuldu. Tarama, TLC ile sellüloz ve silikojel yüzey üzerinde UV indikatör ve polar mobil çözücü ile gerçekleştirildi. HPLC/UV ile tanımlama ve kantitatif değerlendirme gözönüne alındığında, en iyi sonuçlar, diol gruplarla greffed polar bir sabit faz ve pH 2.5'da mobil fazda tamponlanmış bir polar kullanılan direkt faz kromatografi ile elde edilir.

HPLC metodu üzerine laboratuvarında ön geçerlilik testleri uygulandı: tespit edilen sınırlar, standart eğri doğrusalığı ve laboratuvarında tekrarlanabilmesi ve kantitatif değerlendirme örneklerinin tekrarlanabilmesi.

Anahtar Kelimeler: 4-Hidroxyphenyl- β -D-glucopyranoside, 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone, Arbutine, HPLC/UV, Kojik asit (INCI adı) deri beyazlatıcı kozmetik ürünler, TLC

T Klin Kozmetoloji 2002, 3:48-58

Summary

After testing several chromatographic systems described in the literature, the optimal operating conditions were retained to develop a simple and rapid method grouping TLC and HPLC/UV for separation, identification and dosage of kojic acid (CAS RN 501-30-4) or arbutine (CAS RN 497-76-7) in skin-whitening cosmetic products. The screening is carried out by TLC on cellulose plate and by TLC on silicagel plate with UV indicator and polar mobile solvent. Regarding identification and quantitative determination by HPLC/UV the best results were obtained by direct phase chromatography using a polar stationary phase greffed with diol groups and a polar buffered mobile phase at PH 2.5.

Intralaboratory prevalidation tests were carried out on the HPLC method: detection limit, linearity and intralaboratory repeatability of standard curves and repeatability of samples quantitative determination.

Key Words: 4-Hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside-2-hydroxymethyl-4-pyrone, Arbutine, HPLC/UV, Kojic acid (INCI name=, Skin-whitening cosmetic products, TLC

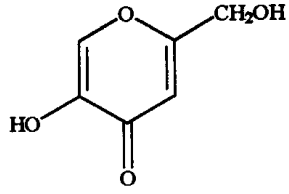
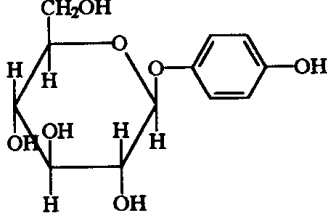
T Klin J Cosmetol 2002, 3:48-58

Yakın zaman önce, kozmetik ürünler içinde hidroquinone'un bir deri açıcısı ürün olarak uygulanması Avrupa Konseyi (EC) (İdari Konseyin Etkileri 76-768/EEC'in teknik gelişmesine 24. uyumu) tarafından iptal edildi.

Uzun kullanımdan sonra, ilaç yan etkileri için belirgin bulguların özellikle derideki okronotik değişikliklerin yüksek prevalansı, önceki İdari Konsey 76/768/CEE no'lu direktifi son teknik ve bilimsel gelişmelere adaptasyonu için EC'yi hızlandırdı. AB üye ülkelere 30 Haziran 2000'i geçmeyecek şekilde, tamamlamak için gerekli

yasaları, düzenlemeleri ve idari koşulları, idari zorlamalar ve hidroquinone içeren deri açıcı kozmetik ürünlerin 31 Ekim 2000'den sonra tüketiciye ulaşmasını garanti edecek önemli önlemleri almaları önerildi.

Bununla beraber Avrupa'daki kozmetik formüllerde Asya kökenli, alternatif aktif maddeler ortaya çıkarıldı. Bunların arasında, melanin biyosentezi ile etkileşen iki tirozinaz inhibitörü vardır: 5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4-pyrone (IUPAC) veya kojik asit (INCI) ve 4-hydroxyphenyl- β -D-glucopyranoside veya arbutin

**Kojik asit****Arbutin****Şekil 1.** Kojik asit ve arbutine'in yapısal formülleri.

(Şekil 1). Heriki bileşik de, Avrupa Konseyi'nin kozmetik ürünler hakkında uzman komitesi (Halk Sağlığı Komitesi)'nin son aktif prensipler listesinde, deri açıcı ürünler olarak adlandırıldı.

Kojik asit (KA) *Aspergillus*, *Penicillium* ve *Acetobacter* mantarlarının sekonder metabolitidir. Kozmetik içerikler Avrupa Envanterinde "katkı maddesi" olarak listelenmiştir. İsveç'de kozmetik içerik olarak uygulamasında yasaklama vardır. Tersine, Arbutin (AR), bazı *Ericaceae*'den özellikle *Arctostaphylos uva ursi* (CAS RN 84776-10-3) ve *Arbutus unedo* (CAS RN 84012-12-4)'den elde edilir. Her iki elde edilen üründe Kozmetik İçerikler Avrupa Envanterinde botanik maddeler olarak listelenmiştir. KA'nın deri depigmentasyon aktivitesi, tirozinaz'ın katekolaz aktivitesi ve kreolazın inhibisyonundan kaynaklanır (1). AR, L-dopa ile tirozinaz üzerindeki reseptör yeri için yarışır ve L-dopa'nın L-dopaquinone'a oksidasyonunu yavaşlatır (2).

Kozmetik kullanımda, KA'nın güvenilirliğini değerlendirmek için, bulunabilen literatür verileri yetersizdir ama insan sağlığını tehlikeye sokabilecek toksik potansiyel dikkat çekmektedir. Literatürde KA'nın deri irritasyonu ve sensitizasyonu rapor edilmektedir (3,4). Sistemik toksisitenin ana hedef organları karaciğer ve böbreklerdir (5). Ek olarak, üreme çalışmaları ratlar için embriyotoksik potansiyel göstermektedir

(6). Mutajenik ve genotoksik sonuçları kesinleşmiş değildir (7,8). Dahası, deri absorpsiyonu hakkında bilgi yeterli değildir. AR, asidik şartlarda D-glukoz ve hydroquinone'a hidrolize olur ve böylece hydroquinone'un istenmeyen sağlıyan etkilerini gösterir.

Hazırlayıcı Analitik Çalışmalar

Literatürde, fenollerin (11), mikotoksin ve aflatoksin (12-18) gibi mantar metabolitlerinin ve aktif bitkisel komponentlerin (19-21) analizi için çok sayıda kromatografik metod sunulmaktadır. Yeni deri açıcı preparatların rutin analizi çerçevesinde, özellikle erken yayınlanmış metodların düzenlenmesinden ziyade, deneysel metodları geliştirmek ve optimize etmek açıkça daha çok ilgi uyandırmaktadır. Bu çalışma, yüksek basınçlı likid kromatografi (HPLC) ile kombine, ince tabaka kromatografi (TLC) kullanılarak KA ve AR tanımlanmasına göre tasarlanmıştır.

Fenoller, şekerler ve γ -pyron'lar için ayrı ayrı değişik polariteli çözücüler ve sprey solüsyonlar geliştirilerek kullanılan, RP-18 yüzeyler üzerinde geri dönüşebilir bölmeli faz TLC uygulanan ve silika yüzeyler üzerinde TLC adsorpsiyonuyla beraber birçok hazırlık çalışmaları, ne yazık ki kesin sonuca ulaşmaktan uzaktı. KA ve AR'nın hassas ayırımı, mobil faz olarak ethylasetat: methanol:su oranı (85:17:13, v:v) kullanılarak TLC adsorpsiyonuyla elde edildi. Önceden, Van Haelen (19), bu tekniği, çiğ tıbbi bitkilerden elde edilen biyolojik aktif unsurların dansitometrik tespitiyle uyumlu bir şekilde uygulamıştı. Tersine, polar asidik developerli sellüloz yüzeylerin üzerinde, AR'nin değil sadece KA'nin migrasyon yaptığı gözlenmişti. Bu ayırım, *Aspergillus spp.*'den türetilen aflatoksin çalışması için Zeringue (13) tarafından uygulandı. Bütün bu son kromatografik metodlar, piyasada bulunabilen kozmetik formüllerdeki KA ve AR'in varlığını hızla tarayabilecek şekilde seçildi (Tablo 1'e bakınız).

Ek olarak, TLC ile hazırlık tanımlanmasını doğrulamak ve konsantrasyonları kantitatif olarak değerlendirmek için, HPLC analizleri yapıldı. HPLC ayırımının optimizatörü, bir grup izokratik

Tablo 1. İnce tabaka kromatografik tarama

Deri açıcı	Yüzey	Bulunma ortamı	Rf	Tespit sınırı (ig)
Kojik asit	Selüloz	UV 366 nm, ferrik klorid	0.81	4.5
Kojik asit	Silikajel	UV 366 nm	0.69	n.d.*
Arbutine	Silikajel	α -Naphtol	0.53	0.75
Arbutine	Silikajel	Gibbs reagent	0.53	1.5

*tespit edilmedi

şartlar altında uygulanan değişik denemelere dayanıyordu. Artan polariteyle kullanılan kolonlarla geri dönüşebilir fazdan normal faz'a kadar değişen özellikler, sabit fazlar tarafından, artan polariteyle uyumlu kolonlarla çevrilmişti (C-18, C-8, Cyano and Diol), bütün mobil fazlar, değişik pH'larda tamponlarla karışmış veya nötral olsun, polar kromatografik performans ve pik rezolüsyon için ayrı ayrı optimal şartların seçimli retansiyon zamanı değerlerine (Rt), CFR asimetri faktörüne (CFR) veya USP tailing faktörüne (TF) dayanıyordu ve biz son parametreler için 1.0'da ideal değeri amaçladık:

$$CFR = w [0.10]/F[0.10]$$

$$T = w [0.05]/F[0.05]$$

%10 yükseklikte w[0.10] ve F[0.10] pik genişlik ve pik üst sınırdı ve %5 yükseklikte ise w[0.05] ve F[0.05] pik genişlik ve pik üst sınırdı.

Geri dönüşebilir faz HPLC ile sağlanan sonuçlar, tatminkar değildi. Rt değerleri hiçbir zaman 1.7 dakikaya erişmedi. Dahası, KA ve AR için ayrı ayrı range'leri 1.22'den 4.09'a ve 0.85'den 2.61'e değişen CFR değerleriyle zayıf simetri ve rezolüsyon yokluğu gözleniyordu. Normal faz HPLC ile oldukça iyileşmiş sonuçlar ve asidik bir mobil fazla, ürün elde edildi. 2.5 dakikada büyük Rt değerleri ve azalmış CFR ve TF değerleri her iki analyte'ler içinde iyi kromatografik şartları doğruluyordu. Optimal ayırım ve rezolüsyon, bir diol kolon (en polar olan) ve pH= 2.5'da bir metanol: 0.05 M KH₂PO₄ (65:35, v:v)'ın mobil fazı ile eşit kromatografik şartlarda elde edildi. Asit tamponlardan yararlanmasıyla, belirgin olarak CFR ve TF değerleri düştü.

Her kantitatif değerlendirme, önemli derecede, aktif bileşimin kalitatif TLC değerlendirmesiyle

Tablo 2. Optimal ayırım şartlarında kojik asit ve arbutine piklerinin HPLC/UV kromatografik parametreler

Bileşim	Retansiyon zamanı (dk)	Asimetri faktörü	Tailing faktörü
Kojik asit	3.4	1.08	1.18
Arbutine	3.9	1.18	1.11

öncelikli oluyordu ve standart solüsyonların korunmuş spektrumları ile örnek spektrumu karşılaştırması için diod sıra bulma sistemi ve spektrofokusla donatılmış HPLC ile doğruluğu kontrol edilmişti. En iyi uygulanabilen analiz tekniği tespit sınırı, konsantrasyon doğrusalığı sinyali, tekrarlanabilirlik ve ara değerlendirme için kontrol edildi.

Deneysel protokoller

Kojik asit ve arbutin'in ince tabaka kromatografi ile bulunması

Reaginler

Milli-Q purifikasyon sistemiyle (Millipore, Bedford, MA, USA) yüksek kaliteli su hazırlandı. Analitik derecelendirmeye göre bütün reagentler: etanol (Merck, NJ, USA), formik asit (%99, Carlo Erba, Milan, Italy), 2-butanone (%99, Acros Organics, Geel, Belgium), tert-butanol (%99.5, Acros Organics), ferrite kloride (Merck), α -naphtol (F.S., Merck), sülfürik asit (%40, Merck), 2,6-dikloroquinone-4-chlorimide (GR, Merck), metanol (Lichrosolv, Merck) ve anhidroz sodyum karbonat (extra-pure DAB, Merck) şeklinde sıralandılar. KA ve AR standartları ayrı ayrı Sigma-Aldrich ve Extrasynthese tarafından sağlandı.

Aparatlar

Kromatografik analizler, konvansiyonel camdan geliştirilmiş odalarda yerleştirilmiş silikojel yüzeyler (F₂₅₄, 20 cm x 20 cm 0.25 mm, Merck) ve/veya sellüloz yüzeyler (Macherey-Nagel 300-25, UV 254, 20 cm x 20 cm x 0.25 mm, Alltech)'le uygulandı. Analyte spotlar, bir UV lamba altında açığa çıkarıldı (Ultraviolet Products Inc.)

Standart solüsyonlar

KA'nın çalışılan standart solüsyonları, stok bir solüsyonun etanolde (12 g L⁻¹) uygun sulandırılmasıyla günlük olarak hazırlandı (6, 4.5, 3 ve 1.5 g L⁻¹). Benzer olarak, AR'nın standart solüsyonları da, stok solüsyonun sulandırılmasıyla (etanolde 12 g L⁻¹) elde edildi (4.5, 3, 1.5 ve 0.75 g L⁻¹).

Örnek preparasyon

Toplam 3.5 g orijinal kozmetik ürün etanolle vidalı kapaklı bir 10 ml'lik cam tüp içinde ve 20 dk'lık bir ultrasonik banyoda kuvvetlice karıştırıldı. Kalan kolloidal solüsyon sonra 20 dakikalığına 4000 r.p.m.'de santrifüj edildi, kromatografik analizler supernatant solüsyonla tamamlandı.

Sellüloz yüzeyde TLC

Sellüloz yüzeyler üzerinde, 11 µl KA örneği solüsyonu ve alternatif olarak da 1 µl standart solüsyonları uygulandı. Bunlar yaklaşık 18 cm yüksekliğinde 100 ml'lik tert-butanol: 2-butanon:su:formik asid oranı (40:30:15:15, v:v) olan karışımını içeren onaylı kromatografik kâpta develope edildi. İşlemden sonra yüzeyler 5 dakika boyunca hood'da kurutuldu.

Tespit edilme

KA, 366 nm'de yeşil floresansta göze çarptı. KA spotları ise (R_f=0.81) bir ferrik klorid solüsyonuyla (%50 etanolde %2 m/m) vaporizasyondan sonra görünmeye başladı. Bulunma sınırları, ayrı ayrı 4.5 µg KA (standart solüsyon) veya örneğin %0.117 g'i (m:m) arasındaydı.

Silikajelde TLC

Benzer olarak, iki eş silikajel yüzey KA standartları (1 µL), AR standartları (1 µL) ve

kozmetik örneklerle (11 µL) yüklendi. Bunlar etil asetat:metanol:su oranı (85:17:13, v:v) ile yaklaşık 18 cm'lik bir yüksekliğe kadar develope edildi ve sellüloz yüzeyler gibi hood altında kurutuldu.

Gibbs reagin'i

İkinci yüzey üzerine, 2,6-dikloroquinone-4-chlorimide (%1'lik metanolde) ve sodyum karbonat (%2'lik suda) başarılı bir şekilde spreylendi. Renkler 45 dakika sonra ortaya çıktı.

R_f değerleri KA ve AR için ayrı ayrı 0.69 ve 0.53'dü. AR'nın bulunma limitleri α-naphtol reaginli örneğin 0.75 µg (standart) veya %0.0019 (m:m) ve Gibbs reaginli örneğin 1.5 µg (standart) veya %0.0039 g dolaylıydı.

HPLC-UV ile kojik asit ve arbutane'in tanımlanması ve kantitatif değerlendirilmesi

Reaginler

Bütün solüsyonlar için yüksek kaliteli su (Millipore Milli-Q) kullanıldı. Analitik derecenin yükselmesine göre bütün reaginler: acetoneitrile (Lichrosolv, Merck), potasyum dihidrojen fosfat (p.a., Merck) ve metanol (p.a. Merck)'du.

Aparatlar

*Yüksek performans likid kromatograf Spectra-sistem P4000 + vakum modül SCM 1000 + 20 µl'lik bir loop'lu valf ekipmanı (Rheodyne, CA, USA) + veri tedavi sistemi spectrafocus (Spectra, CA, USA) + kişisel bilgisayar (PC 1000 Dell, Optiplex GL5133);

Yüksek performans likid kromatografi ve data sistemi -dual başlı karşılıklı pompa içeren- (Hewlett Packard 1050) + 20 µL'lik loop'lu valf ekipmanı (Rheodyne) + değişen dalga boylu UV-VIS absorbance detector (Hewlett Packard 1050) + kişisel bilgisayar (PC 1000 Dell, Optiplex G 166).

Standart solüsyonlar

Stok standart solüsyonlar, hassasça değerlendirilen 200 mL'lik bir volümetrik yassı kâpta 0.0750 KA veya 100 mL'lik volümetrik yassı kâpta 0.750 g AR ile hazırlandı ve ölçekli seviyeli asetonitril'de eritildi.

KA'nın çalışılan standart solüsyonlarının, 150 x 10⁻³, 75 x 10⁻³, 37.5 x 10⁻³, 18.75 x 10⁻³ ve 9.375

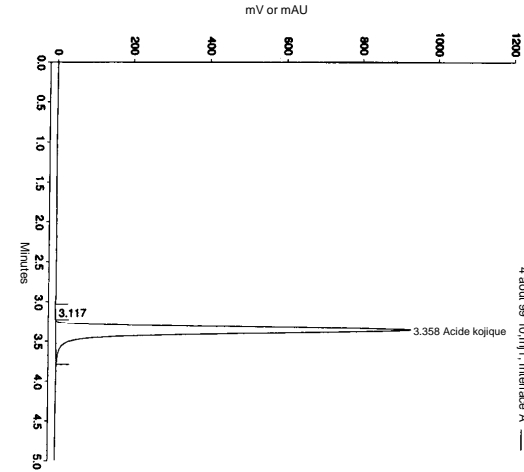
Page 1
Reported On: 04-08-99 16:07:29

Mode: Acquired Data
Original Results: C:\TSP\HP1050UV\Data\4 aout 99 10.RES
Notes:
Colonne diol Acide kojique 0.15 g/l (ACN)
ACN 70 KH₂PO₄ 30 F=1 ml/min P=23 bar 270 nm
Analysis Report

Name: 4 aout 99 10 Vial:10 Injection: 1 of 1
Typ: Sample Injected On: 04-08-99 13:05:12
Injection Volume: 10.0 uL

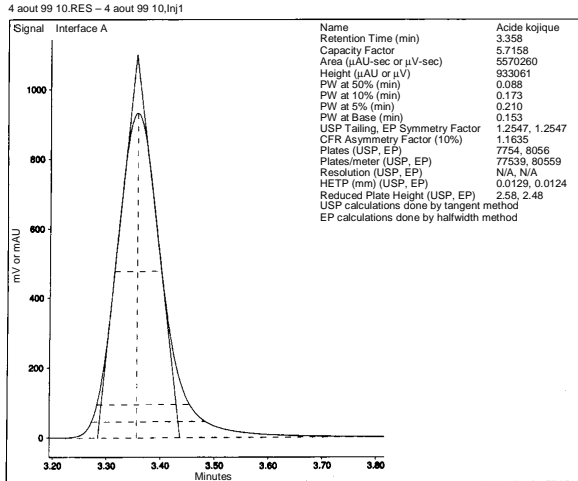
Acquisition Log
Column Pressure: N/A Column Temperature (C): N/A Pump Flow Stability: N/A
Noise (microAU):3 Drift (microAU/min):3e+001
Run-Time Messages: None

Signal 1: Interface A
Calculation Type: Area Percent (Area)



Component	RT (min)	Area	Height	Area%	Peak Type
Unident0001	3.117	10124	1253	0.18	Fused
Acide kojique	3.358	5570260	933061	99.82	Fused
Totals		5580384	934314	100.00	

System: HP1050UV on LABNET unit 1 Analyst: Virginie PC1000 Ver 3.0.1
Acquisition Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\kojic acid essai.AQM 27-07-99 09:13:32
Calculation Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\acide kojique.CAM 27-07-99 10:48:50
Report Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\acide kojique essai.RPM 04-08-99 16:01:48



Şekil 2. Standart kojik asit enjeksiyonu için elde edilen HPLC/UV 270 nm kromatogram.

10^{-3} gL⁻¹'lik konsantrasyonları, stok solüsyonun

asetonitrille uygun sulandırılması sonucu hazırlandı.

AR'nin çalışılan standart solüsyonlarının, 600×10^{-3} , 300×10^{-3} , 150×10^{-3} , 75×10^{-3} ve 37.5×10^{-3} gL⁻¹'lik konsantrasyonları stok solüsyon asetonitrille uygun sulandırılması sonucu hazırlandı.

Örnek hazırlanması

Örnekler, 10 mL'lik volümetrik yassı kaplarda hassasça değerlendirilirken ürün içeren KA'nın 0.100 g'ı ve ürün içeren AR'nin 1.000 g'ı ile hazırlandı. Tartılmış aliquots (E), transparan solüsyonlar elde etmek için, 10 mL acetoneitrille yayıldı, 20 dk ultrasonla kuvvetlice karıştırıldı, 20 dk boyunca 4000 r.p.m.'de santrifüj edildi veya Millipore membranlarda (0.45 mm) filtre edildi. Kromatografik analizler için supernatant solüsyonlar veya filtratlar kullanıldı.

Yüksek performans likid kromatografisi

İşlem prosedürü

Kromatograf: HP 1050 ve/veya Spectrasystem P4000 + Spectrafocus.

Analitik kolon: Lichrosorb 10 Diol kolon (Chrompack; 10 µ 250 x 4.6 mm).

Mobil faz: Bütün çözücüler ayrı ayrı olmak üzere acetoneitrille: KH₂PO₄ (0.05 M) karışımı (70:30, v:v) 1.0 mL dk⁻¹'lık bir akım hızıyla pompalandı. Reservuarlardan gazı uzaklaştırıldı (Hewlett-Packard).

Tespit edilme: KA için 270 nm ve AR için 286 nm dalga boylarında maksimum UV absorpsiyonu elde edildi.

Etken maddenin, TLC taramasından sonra, HP 1050 kromatograf'in UV detektörü KA için 270 nm'ye ve AR için 286 nm'ye ayrı ayrı ayarlandı. Hassas retansiyon zamanları ve kalibrasyon eğimleri standart solüsyonların her birinin (Şekil 2 ve 3) standart enjeksiyonlarından elde edildi. Kozmetik örnekleri için, KA veya AR sinyali, HP 1050 sistemde ölçülen retansiyon zamanları ve spectrasystem P 4000 + Spectrafocus'un spectral kitaplığını kullanarak kaydedilen standart

Page 1
Reported On: 26-07-99 16:19:39

Mode: Reprocessed Data
Original Results: C:\TSP\HP1050UV\Data\26 jül 1999 7.RES
Reprocessed Results: C:\TSP\BIN\Evaluate Calculation Method.RMS

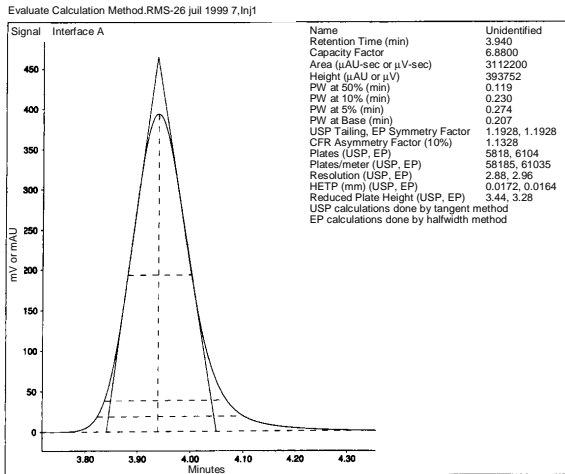
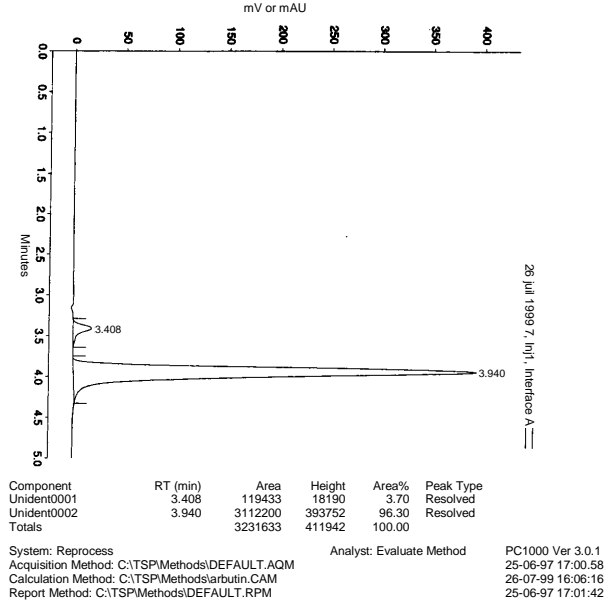
Analysis Report

Name: 26 jül 1999 7 Vial: 7 Injection: 1 of 1
Type: Sample Injected On: 26-07-99 13:58:14
Injection Volume: 10.0 uL

Acquisition Log
Column Pressure: N/A Column Temperature (C): N/A Pump Flow Stability: N/A
Noise (microAU): 7 Drift (microAU/min): -7e+001

Run-Time Messages: None

Signal 1: Interface A
Calculation Type: Area Percent (Area)



Şekil 3. Standart arbutine enjeksiyonu için sağlanan HPLC/UV 286 nm kromatogram.

solüsyonlarla absorban spektrumun karşılaştırılması

ile doğrulandı. Hem standart hem de örnek spektrum için %99'luk bir korelasyon katsayısı sağlamalıydı.

Hesaplama

Konsantrasyonlar, mg L⁻¹ (©) olarak, mV ve standart kalibrasyon denklemleri olarak verilen pik alanlardan elde edildi. Kozmetik ürünlerdeki KA veya AR konsantrasyonları, şu şekilde elde edildi:

$$G\%(m/m) = (\text{©} \cdot DF) / 10^4 \cdot E$$

E: Tartılan miktar

DF: Sulandırma faktörü

Sonuçlar

Açıklanan metodoloji, Belçika piyasasında (crème éclaircissante "activation bio-enzymatique" Phytomer) bulunabilen deri açıcı kremdeki KA'nın tanımlanması ve kantitatif analizinde uygulandı. Kromatografik, spektrometrik ve kantitatif veriler Şekil 4 ve Tablo 3'de, ayrı ayrı sunulmuştur. Kozmetik kremdeki KA konsantrasyonlu, yaklaşık 0.300±0.001 g (m:m)'dir.

Benzer olarak, açıklanan metod piyasadaki bir bileşimin (Bio-performans, Shiseido) AR konsantrasyonunun belirlenmesinde de kullanıldı. Veriler, Şekil 5 ve Tablo 4'de tanımlanmıştır. AR konsantrasyonu yaklaşık 3.110±%0.032 g (m:m)'di.

Öngeçerlilik

Kalibrasyon eğrisinin tekrarlanabilirliği ve ara değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin değerlendirilmesi esas alınarak ISO prensipleri (ISO 5725-1, 1994; ISO 5725-2, 1994) doğrultusunda analitik metodoloji denetlendi. Son çalışma, tekrarlanabilirlik ve ara değerlendirme üzerine odaklandı. Genel olarak tekrarlanabilirlik şartları ve yeniden ortaya koyma şartları ayırt edilebilir. Tekrarlanabilirlik şartları, aynı metodlar aynı laboratuvarında ve kısa bir zaman sürecinde aynı enstrümanı kullanan operatörler analiz edilen benzer test maddelerinden elde edilen verilere dayanır. Standart eğrinin tekrarlanabilirliği, aynı günde yapılan standart eğrideki iki farklı konsantrasyonun 6 ardısına analizinden türetildi. Tekrarlanabilirlik sonuçları Şekil 6 ve 7'de gösterilmiştir, değişkenler

Page 1
Reported On: 04-08-99 16:03:05

Mode: Acquired Data
Original Results: C:\TSP\HP1050UV\Data\4 aout 99 2.RES
Notes:
Colonne diol Echantillon Phytomer 2 dilue au 1/10 (extraction ACN)
ACN 70 KH2PO4 30 F=1 ml/min P=23 bar 270 nm

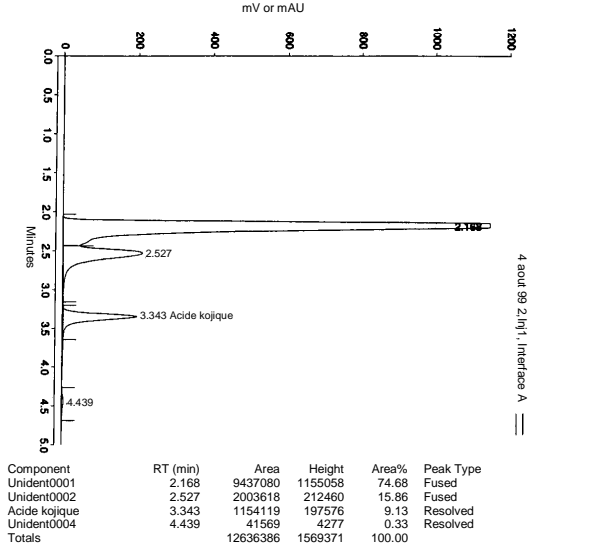
Analysis Report

Name: 4 aout 99 2 Vial: 2 Injection: 1 of 1
Typ: Sample Injected On: 04-08-99 11:04:55
Injection Volume: 10.0 uL

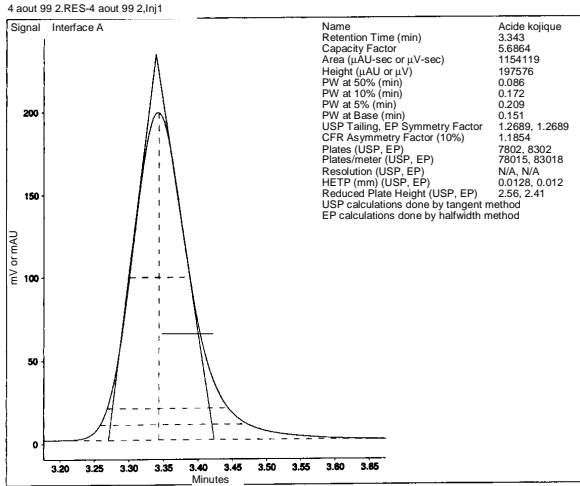
Acquisition Log
Column Pressure: N/A Column Temperature (C): N/A Pump Flow Stability: N/A
Noise (microAU): 4 Drift (microAU/min): -2e+001

Run-Time Messages: None

Signal 1: Interface A
Calculation Type: Area Percent (Area)



System: HP1050UV on LABNET unit 1 Analyst: Virginie PC1000 Ver 3.0.1
Acquisition Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\kojic acid essai.AQM 27-07-99 09:13:32
Calculation Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\acide kojique.CAM 27-07-99 10:48:50
Report Method: C:\TSP\HP1050UV\Methods\acide kojique essai.RPM 04-08-99 16:01:48



Şekil 4. Kojik asit içeren ticari olarak bulunabilen bir örnek için sağlanan HPLC/UV 270 nm, kromatogram.

arasındaki ilişkiyi regresyon denklemlerinin ne

Tablo 3. Ticari olarak bulunabilen örnekteki kojik asidin kantitatif belirlenmesi

	Pik alan (mV)	Kojik asit G% (m:m)
Crème éclaircissante	1209376	0.302
“activation biologique”	1199350	0.300
Phytomer	1202734	0.301
	1207307	0.302
	1201265	0.300
Ortalama	1205403	0.301
Standart sapma	5081	0.001
Varyasyon katsayısı: RSD	%0.42	%0.4

Tablo 4. Ticari olarak bulunabilen bir örnekteki arbutine'in kantitatif belirlenmesi

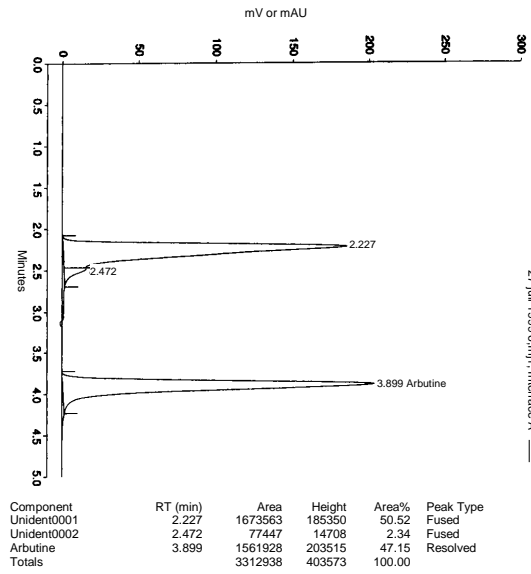
	Pik alan (mV)	Arbutin G% (m:m)
“Bio-performans”	1565407	3.13
Shiseido	1561928	3.12
	1560102	3.12
	1556377	3.11
	1580552	3.16
	1528103	3.06
Ortalama	1558745	3.11
Standart sapma	17184	0.03
Varyasyon katsayısı: RSD	%1.1	%1.04

kadar iyi açıklandığını gösteren, determinaton (R^2) katsayıları devam olarak >0.999'dur. Bu yüksek değeri gözönünde bulundurarak, kalibrasyon doğrusallığı elde edilir. Kopya edilebilme şartları, benzer test maddelerinin aynı metodla ama değişik laboratuvarlarda değişik ekipmanı kullanan değişik operatörlerle analizinden elde edilen verilere dayandığından, bu yönde çalışmalar uygulanmadı. Kopya edilebilme yerine, bu ara değerlendirmeyi belirledik, bu parametre sadece değişen analiz periyodları ve tekrarlanabilme şartları altında elde edilen şartlara dayanıyordu. Kalibrasyon eğrileri için sağlam veriler Tablo 5 ve 6'da ayrı ayrı sunulmuştur.

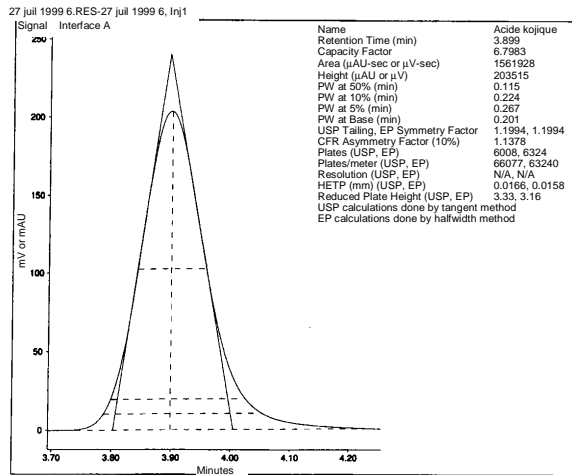
IUPAC tarafından kabul edilen sensitivitenin kantitatif tanımlanması kalibrasyon sensitivitesidir ve bu ilgi dağılımı konsantrasyonunda kalibrasyon

eğrisinin eğimidir. Analitik sensitivite tanımlanması Mandel & Stiehl tarafından önerilmiştir, $\gamma = m/S_s$, kalibrasyon eğrisinin, ölçmenin standart sapmasına bölünmesinin değerlendirilmesini içerir (22). Bu sensitivite

Mode: Acquired Data
Original Results: C:\TSPHP1050UV\Data\27 jül 1999 6.RES
Notes:
Colonne diol Echantillon SHISEIDO dilue au 1/10
ACN 70 KH2PO4 30
F=1 ml/min P=23 bar 286 nm
Analysis Report
Name: 27 jül 1999 6 Vial:6 Injection: 1 of 1
Typ: Sample Injected On: 27-07-99 16:55:04
Injection Volume: 10.0 uL
Acquisition Log
Column Pressure: N/A Column Temperature (C): N/A Pump Flow Stability: N/A
Noise (microAU):5 Drift (microAU/min):-7e-001
Run-Time Messages: None
Signal 1: Interface A
Calculation Type: Area Percent (Area)



System: Reprocess Analyst: Virginia PC1000 Ver 3.0.1
Acquisition Method: C:\TSPHP1050UV\Methods\arbutin essai.AQM 26-07-99 13:43:54
Calculation Method: C:\TSPHP1050UV\Methods\arbutine.CAM 26-07-99 16:37:18
Report Method: C:\TSPHP1050UV\Methods\arbutin essai.RPM 27-07-99 17:13:22



Şekil 5. Ticari olarak bulunan arbutine içeren örnek için HPLC/UV 286 nm kromatogram.

tanımlanması, relatif olarak amplifikasyon faktörlerine duyarsızdır. Solüsyonların en yüksek ve en düşük konsantrasyonları için hesaplanabilen analitik sensitivite ayrı ayrı şöyledir:

KA için, 44×10^6 ve 21.6×10^6 (Tablo 5)

AR için, 6.1×10^6 ve 5.68×10^6 (Tablo 6)

Kalibrasyon eğrisi denklemi ise: $y = 4E + 07x + 9665.3$ 'dür ve determinasyon R^2 katsayısı= 0.9996'dır. Kalibrasyon eğrisinin denklemi ise $y = 5E + 06x + 1897.2$ 'dir ve determinasyon R^2 katsayısı= 0.9999'dir.

Kozmetik örneklerdeki kantitatif belirlemenin tekrarlanabilirliği

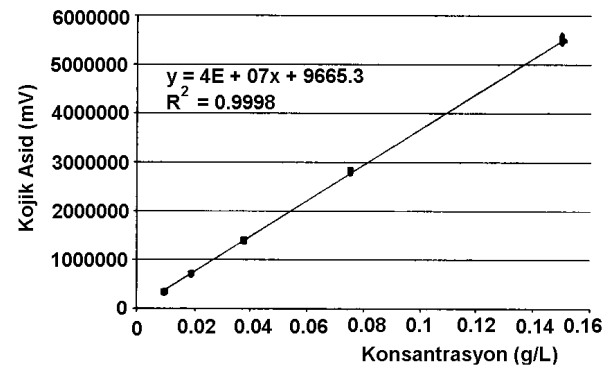
$$\Delta x_{\min} = \bar{x}_1 - \bar{x}_2 \geq ts_2 \sqrt{\frac{N_1 + N_2}{N_1 N_2}}$$

analiz için tam deneysel yöntem gerçekleştirildi. Sonuçlar Tablo 7 ve 8'de sunuldu.

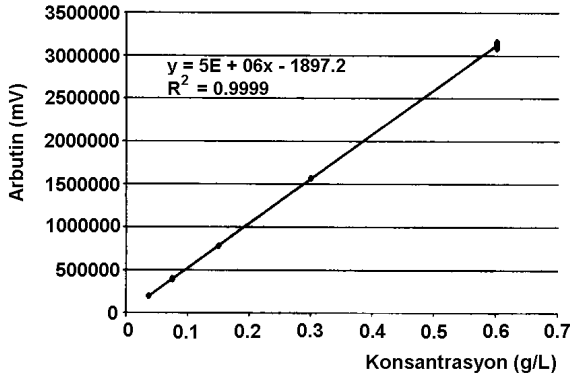
Tespit edilme sınırı

Teorik olarak tespit edilme sınırı, minimum tespit edilebilir kantite Δx_{\min} olarak tanımlanabilir ve aşağıdaki formülde (22) hesaplanan boş sinyalden belirgin olarak farklıdır:

x_1 ve x_2 ; iki farklı konsantrasyonlar için ortalama absorpsiyon değerleri (veya pik alanlarıdır), t: freedom'ın ($\alpha=0.05$) $N_1 + N_2 - 2$ derecesi için t-değeridir; s_2 deneysel verinin yayılımıdır ve N_1 ve N_2 'de ayrı ayrı örnek ($N_1=6$) ve boş ($N_2=1$) için deneysel verilerin sayısıdır. Kromatografik



Şekil 6. Tekrarlanabilirlik, kojik asidin kalibrasyon eğrisi.



Şekil 7. Tekrarlanabilirlik, arbutine'in kalibrasyon eğrisi.

ayırımında pik karışımlarının yokluğuna bağlı; KA ve AR'nın tespit edilebilme sınırları, kozmetik ürünlerde tahmin edilebilir.

Kozmetik üründe KA için karşılık gelen tespit edilebilme sınırı; 20 µL'lik enjeksiyon başına 10.8 ng veya %0.00054 g (m:m)'dir. Kozmetik üründeki AR için karşılık gelen edilebilme sınırı; 20 mL'lik enjeksiyon başına 37 ng veya %0.00185 g (m:m)'dir.

Sonuçlar

KA ve AR, etil asetat:metanol:su oranı (85:17:13, v:v)'den oluşan bir mobil fazı

kullanarak silikojel yüzeyler üzerinde tahmin edici oranda ayrıştırılabilir. Bileşikler, bize kolay ve ucuz bir tarama tekniği kullanarak, TLC ile iyi şekilde açığa çıkartılabilir.

Başlangıç HPLC sonuçları, kimyasal yapılarındaki çarpıcı farklılığa rağmen, KA ve AR'nin her ikisi de benzer kromatografik davranış göstererek şaşırtıcı bir gözleme yol açtılar. Bu polar bileşikler ileri derecede farklı mobil fazlar kullanılmasına rağmen, C-8 ve C-18 gibi apolar sabit fazlarda zayıfça tutuldular. Mobil fazda asit tamponların eklenmesi retansiyon zamanlarını arttırmadı ama pik simetriterinin belirgin olarak bozulmasına neden oldu.

Normal faz kromatografisi, çalışılan simetrik pik ve yaklaşık uygun TF değerleri olan kromatogramlar ve bileşikler için yüksek retansiyon zamanları ile sonuçlandı. Özellikle asit tamponlar kullanılırken, CFR ve TF değerleri yaklaşık ideal örneklerdi.

Her iki bileşik için en iyi ayırıştırma ve rezolüsyon şartları, mobil faz olarak pH=2.5'da acetonirile: 0.05 M KH₂PO₄ (65:35, v:v) oranıyla kombine birçok polar sabit fazın (Diol kolon) eşit kromatografik ortamlarda elde edildi. Maksimal absorpsiyon dalgaları (270 ve 286 nm) çok

Kojik asit (mV)

Tablo 5. Kojik asidin kalibrasyon verileri: (m=40x10⁶): analitik sensitivite

Kojik asit (g. L ⁻¹)	Pik alanı	Ortalama	Standart sapma	Varyasyon katsayısı	Analitik sensitivite
150x10 ⁻³	5442692	5516609	50346	%0.91	44x10 ⁶
	5479820				
	5581959				
	5522010				
	5556062				
75x10 ⁻³	5517109	2802172	2594	%0.09	
	2800338				
37.5x10 ⁻³	2804006	1388802	1364	%0.10	
	1387837				
18.75x10 ⁻³	1389766	693348	4460	%0.64	
	690194				
9.375x10 ⁻³	696502	332597	6148	%1.85	21.6x10 ⁶
	336375				
	322217				
	340482				
	333796				
	330979				
	331735				

Tablo 6. Arbutine'in ($m=5 \times 10^6$) kalibrasyon verileri, analitik sensitivite

Arbutine (g. LI ⁻¹)	Pik alanı	Ortalama	Standart sapma	Varyasyon katsayısı	Analitik sensitivite
600x10 ³	3112200 3162549 3125125 3119625 3086515 3140339	3124392	25756	0.82	6.1x10 ⁶
300x10 ³	1567251 1574278	1570765	4969	0.31	
150x10 ³	775114 775627	775371	363	0.05	
75x10 ³	386236 394514	390375	5853	1.5	
37.5x10 ³	192945 194159 194912 191897 192632 190116	192777	1695	0.88	5.68x10 ⁶

Tablo 7. Kojik asit, ticari olarak bulunabilen bir örnekte kantitatif belirlenebilirliğin tekrarlanabilirliği

Belirleme n°	1	2	3	4	5	6
Pik alanı (mV)	1081699	1154119	1154828	(988642)	1206353	1135070
Ortalama	1120119 (1146414)					
Standart sapma	75872 (44832)					
RSD	%6.77 (%3.91)					

Tablo 8. Arbutine, ticari olarak bulunabilen bir örnekte kantitatif belirlenebilirliğin tekrarlanabilirliği

Belirleme n°	1	2	3	4	5	6
Pik alanı (mV)	1686673	1617763	1693526	1675946	1633180	1656365
Ortalama	1660576					
Standart sapma	30345					
RSD	%1.83					

yakındı. KA ve AR için retansiyon zamanları sırayla 3.4 ve 3.9 dakikaydı. Retansiyon zamanlarının yakın değerlerine bağlı olarak, aynı kozmetik bir preparasyonda aktif içerikler kullanıldığında pik aşırımları oluşabilir.

Kantitatif bir belirlenme, TLC ile aktif maddenin tespit edilmesiyle, önde gelen öneme sahip olabilir ve tanımlanma, HPLC ile kombine bir Spectrafocus veya Diodearray tespit sistemi ile doğrulanabilir. Burada, literatür spektrum, standart

spektrum ve "bilinmeyen" örnek spektrum karşılaştırılması uygulanabilir (spektrumun kaplanması).

Metodun başlangıç onaylanması, AR'nin teorik tespit edilme limitinin, KA'ninkinden 4 katı fazla olduğunu göstermektedir. Bu, AR için daha düşük analitik sensitivite değerleriyle doğrulanır. Doğrusallık, tekrarlanabilirlik ve kalibrasyon eğrisinin ara değerlendirmesinin deneysel sonuçları tatminkardır, ticari örneklerdeki AR'nin kantitatif

belirlemenin tekrarlanabilirliği gibi. Tersine, ticari örneklerdeki KA'nın kantitatif belirlenmesi çoğaltılabildi (Tablo 7). Taslak değer önemsizdir, relatif %3.91'lik bir standart sapmayla örnek analizinin tekrarlanabilirliğini ortaya koyar. Bununla beraber, KA ve AR'nin kullanım surveyans çalışmaları programlandığında, önerilen metod yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

- Cabanes J, et al. Kojic acid, a cosmetic skin-whitening agent, is a slowbinding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46:982-5.
- Matsuda H, et al. Studies of cuticle drugs from natural sources. I.V. and Inhibitory effects of some Arctostaphylos plants on melanin biosynthesis. *Biol Pharm Bull* 1996; 19:153-6.
- Nakagawa M, et al. Contact allergy to kojic acid in skin care products. *Contact Dermat* 1995; 32:9-13.
- Garcia A, et al. The combination of glycolic acid, hydroquinone for the treatment of melasma and related conditions. *Dermatol Surg* 1996; 13:210.
- Giroir LE, et al. Toxic effects of kojic acid in the diet of male broilers. *Poult* 1991; 70:449-503.
- Choudary DN, et al. Effect of some mycotoxins on reproduction in pregnant albino rats. *J Food Sci Technol* 1992; 29:264-5.
- Shibuya T, et al. Mutagenicity, dominant lethal test of kojic acid. Amestest, Forward mutation in cultured Chinese hamster cells, dominant lethal test in mice. *J Toxicol Sci* 1982; 7:255-62.
- Wei CL, et al. Mutagenicity studies of kojic acid. *Toxicol Lett* 1991; 59:213-20.
- Deisinger PJ, et al. Human exposure to naturally occurring hydroquinone. *J Toxicol Environ Health* 1996; 47:31-46.
- Goeyens A, et al. Surveillance study on skin lightening cosmetics containing Hydroquinone and its ethers. *Archives of Public Health* 2000; 58:199-211.
- Dass HC, et al. Cellulose thin-layer chromatography of phenolic substances. *J Chromatogr* 1972; 67:105-11.
- Zeringue HJ, et al. Extraction, separation of the greenish-yellow fluorescent material from aflatoxigenic *Aspergillus* spp. Infected cotton Lint by HPLC/UC/F.L. *J Agric Food Chem* 1998; 46:1071-75.
- Paterson RRM, et al. Standardized one and two dimensional thin-layer chromatographic methods for the identification of secondary metabolites in *Penicillium* and other fungi. *J Chromatogr* 1986; 368:249-64.
- El-Sharkawi SH. Kojic acid production cocoa juice by *Aspergillus flavus* entrapped in calcium alginate. *Boll Chim Farmaceutico* 1995; 134:316-9.
- Durackova Z, et al. Systematic analysis of mycotoxins by thin-layer chromatography. *J Chromatogr* 1976; 116:141-54.
- Russel R, et al. Gradient HPLC using Alkylphenone retention indices of insecticidal extracts of *Penicillium* strains. *J Chromatogr* 1989; 483:153-68.
- Frisvad C, et al. Standardized HPLC of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on Alkylphenone retention indices and UV-Vis spectra (diode-array detection). *J Chromatogr* 1987; 404:195-214.
- Frisvad C, et al. HPLC determination of profiles of mycotoxins and secondary metabolites. *J Chromatogr* 1987; 392:333-47.
- Vanhaelen M, et al. Quantitative determination of biologically active constituents in medicinal plant crude extracts by TLC-Densitometry. *J Chromatogr* 1983; 281:263-71.
- Kraus L, et al. Hochleistungs flüssigkeit Chromatographie von Arbutin und Methylarbutin. *J Chromat* 1979; 170:269-71.
- Kenndler E, et al. Determination of Arbutin in *Uvae-Ursi folium* (Bearberry leaves) by capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr* 1990; 514:383-8.
- Skoog X, et al. *Fundamentals of Analytical Chemistry* 7th ed. Orlando, FL: Saunders College Publishing, 1996: 55.

*Orijinal İngilizce şeklinde Türkiye Klinikleri tarafından tercüme edilmiştir. Türkçeye tercümesinin doğruluğundan Türkiye Klinikleri sorumludur, Blackwell Science Limited veya Society of Cosmetic Chemists sorumluluk kabul etmemektedir.

Translated by Türkiye Klinikleri Publishing House from the original English language version. Responsibility for the accuracy of the translation in the Turkish language rests solely with Türkiye Klinikleri Publishing House and is not the responsibility of Blackwell Science Limited or the Society of Cosmetic Chemists.