วารสารวิชาการสาธารณสุข
ปีที่ 23 ฉบับที่ 2 มีนาคม - เมษายน 2557

Journal of Health Science
Vol. 23 No. 2 March - April 2014

นิพนธ์ต้นฉบับ *Original Article*

การวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิกเครื่องสำอางด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography

เพียงใจ วงศ์สุวรรณ วท.บ. (เคมี), วท.ม. (เคมีวิเคราะห์)
ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น

บทคัดย่อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์สารห้ามใช้ในเครื่องสำอาง 2 ชนิดคือ ไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก ในตัวอย่างเครื่องสำอาง โดยใช้การวิเคราะห์แยกสารด้วยเทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ซึ่งจะลดปัญหาการวิเคราะห์กรณีที่ตัวอย่างมีการผสมของสารทั้ง 2 ชนิดในตัวอย่างเดียวกัน พร้อมทั้ง ลดขั้นตอน และระยะเวลาในการตรวจหาสารเคมีที่เป็นอันตราย การวิเคราะห์แยกสารโดยใช้เทคนิค HPLC มีเฟสคงที่คือคอลัมน์ออกตะเดคซิลไซเลน (C 18) ขนาด 4.6 x 250 มิลลิเมตร อนุภาคขนาด 5 ไมครอน เฟสเคลื่อนที่คือน้ำผสมกับเมทานอล อัตราไหลใช้ระบบเกรเดียน ฉีดสารครั้งละ 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีด้วยไดโอดอาร์เรย์ (Diode Array) ที่ 295 และ 353 นาโนเมตร ไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก แสดงกราฟออกมาที่เวลาประมาณ 4 และ 13 นาที ตามลำดับ การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ พบว่ากราฟมาตรฐานในช่วงความเป็นเส้นตรงอยู่ระหว่างความเข้มข้น 20 - 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าสัมประสิทธิสหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.999 ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) สำหรับไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก มีค่า 10 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการทำซ้ำ มีค่าน้อยกว่า 2.00 วิธีนี้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งสามารถนำไปใช้ตรวจวัดชนิดและปริมาณไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิกในเครื่องสำอาง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในคราวเดียวกันและให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ วิธีนี้พัฒนาขึ้นเพื่อลดปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีการใส่สารห้ามใช้ทั้งสองชนิด ซึ่งวิธีตามมาตรฐานของอาเซียนจะต้องทำการวิเคราะห์ 2 ครั้งและกรดเรทิโนอิกจะรบกวนการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนเพราะจะคงค้างอยู่ในคอลัมน์นาน วิธีนี้จึงเหมาะที่จะมาทดแทนวิธีดังกล่าว

คำสำคัญ: **การวิเคราะห์สารห้ามใช้, โครมาโตกราฟี, ไฮโดรควิโนน, กรดเรทิโนอิก**

บทนำ

มนุษย์ต้องการที่จะมีใบหน้าและผิวพรรณที่ดูดี สดใส ไร้ริ้วรอย เป็นที่ต้องตาของผู้พบเห็น เครื่องสำอางจึงเป็นสิ่งที่ตอบสนองความต้องการนี้ ทำให้ธุรกิจด้านเครื่องสำอาง มีการแข่งขันสูงทั้งในระดับอุตสาหกรรมหรือคลินิก ความสวยงามมีการแข่งขันสูง สารไฮโดรควิโนนเป็นสารที่สามารถลดความเข้มของสีผิวได้ดี แต่ก็มีผลข้างเคียงที่เกิดโทษสูง ขณะที่กรดเรทิโนอิกมีฤทธิ์กระตุ้นการหลุดลอกของผิวหนังชั้นนอกอย่างรุนแรง ทำให้หลุดลอกได้ง่าย ลดการอุดตันของไขมันที่ผิวหนัง ทำให้ลดการเกิดสิวและผิวพรรณสดใส แต่สารทั้งสองชนิดก็มีผลข้างเคียงสูง การใช้สารดังกล่าวจึงต้องควบคุมดูแล และกระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้เป็นสารห้ามใช้ในเครื่องสำอาง[1,2] จากคุณสมบัติดังกล่าวของสาร

ทั้งสองทำให้มีการลักลอบผสมในเครื่องสำอางเพื่อให้ได้ผลตามความต้องการ ในสถานการณ์ปัจจุบันมีการตรวจพบสารเหล่านี้อยู่เสมอและมีแนวโน้มในการใส่สารทั้งสองชนิดนี้ร่วมในเครื่องสำอางชนิดเดียวเพื่อให้ผู้ใช้เห็นผลเร็วขึ้น ดังเช่น ปี 2554 ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 13 เชียงรายได้ตรวจเครื่องสำอางจำนวน 13 ตัวอย่างพบสารห้ามใช้ทั้งสองชนิดจำนวน 4 ตัวอย่าง และพบเฉพาะไฮโดรควิโนน 2 ตัวอย่าง ปริมาณสารไฮโดรควิโนนอยู่ในช่วงร้อยละ 2.8-5.1 (ปกติสูตรตำรับยาอยู่ที่ 2.0 – 4.0) ปริมาณกรดเรทิโนอิกอยู่ในช่วงร้อยละ 0.01-0.08 (ปกติสูตรตำรับยาอยู่ที่ 0.01-0.10)[3] การตรวจวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดมีวิธีการที่แตกต่างกันทั้งนี้เนื่องจากสูตรโมเลกุลและ สูตรโครงสร้างที่แตกต่างกันอย่างมากของสารทั้งสอง วิธีมาตรฐานของอาเซียนในปัจจุบันการตรวจวิเคราะห์สารดังกล่าวจะใช้เทคนิค High Performance Liquid Chromatography (HPLC) แต่มีสภาวะของเฟสเคลื่อนที่ต่างชนิดกันและการตรวจวัดที่ต่างกัน เทคนิค HPLC อาศัยหลักการแยกสารผสมที่อยู่ในสถานะสารละลาย กระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นระหว่างเฟส 2 เฟส คือ เฟสอยู่กับที่ (column) กับเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) โดยสารจะถูกแยกออกมาในเวลาที่ต่างๆกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการเข้ากันได้ของสารนั้นกับเฟสเคลื่อนที่หรือเฟสอยู่กับที่ สารตัวไหนที่สามารถเข้ากันได้ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่สารนั้นก็จะถูกแยกออกมาก่อน ส่วนสารที่เข้ากันได้ไม่ดีกับเฟสที่เคลื่อนที่ หรือเข้ากันได้ดีกับเฟสอยู่กับที่ ก็จะถูกแยกออกมาทีหลัง และสารที่ถูกแยกออกมาได้นั้นจะถูกตรวจวัดสัญญาณด้วยตัวตรวจวัดชนิดต่าง ๆ จากโครงสร้างของสารทั้งสองดังภาพที่ 1 และ 2 จะพบว่าสารไฮโรควิโนนมีโมเลกุลเล็กและมีสภาพขั้วสูงกว่ากรดเรทิโนอิกซึ่งมีโมเลกุลใหญ่และมีสภาพขั้วต่ำกว่ามาก

ดังนั้นการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดนี้ในอดีตจึงมีการแยกวิเคราะห์ในสภาวะที่ต่างกัน ไฮโดรควิโนนมีการวิเคราะห์หลายสภาวะ เช่น โดยใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น ethanol ผสมกับน้ำ ตรวจวัดที่ UV 295 นาโนเมตร[4] หรือใช้เฟสเคลื่อนที่เป็น methanol ผสมกับน้ำ ตรวจวัดที่ UV 280 นาโนเมตร[5] นอกจากเทคนิค HPLC ดังกล่าวแล้วแล้วยังพบการวิเคราะห์โดยใช้ Capillary electrochromatography[6] เฟสคงที่ส่วนมากเป็น reverse phase สำหรับกรดเรทิโนอิกพบมีการใช้เฟส คงที่เป็น normal phase[7] และ reverse phase[8] เฟสเคลื่อนที่ก็แตกต่างกันไป กรณีที่ตัวอย่างมีการผสมสารทั้งสองชนิดเข้าด้วยกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ไฮโดรควิโนนโดยใช้มาตรฐานของอาเซียน[9] พบมีการรบกวนจากสารกรดเรทิโนอิกที่ถูกชะออกมาภายหลัง ส่วนวิธีของกรดเรทิโนอิกไม่พบปัญหา[10] ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์เพื่อให้ทันต่อสถานการณ์และแก้ไขปัญหาของวิธีวิเคราะห์ดังกล่าว

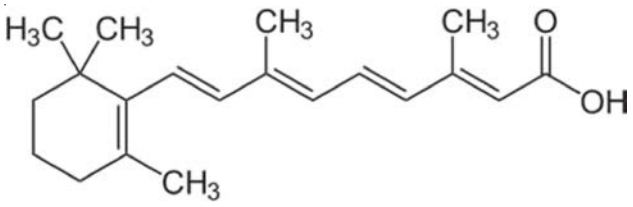
การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีตรวจวิเคราะห์ซึ่งจะลดปัญหาการวิเคราะห์กรณีที่มีการผสมทั้งสารไฮโรควิโนนและกรดเรทิโนอิกในตัวอย่างเดียวกัน พร้อมทั้งลดขั้นตอนและระยะเวลาในการตรวจหาสารเคมีที่เป็นอันตราย

วิธีการศึกษา

ศึกษาหาข้อมูลการวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดแล้วนำมาทำการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม เมื่อพบว่าสามารถวิเคราะห์สารทั้งสองได้แล้วจึงทำการทดสอบการใช้ได้ของวิธีวิเคราะห์ โดยมีรายละเอียดสารเคมีสภาวะ

ภาพที่ 1 โครงสร้างสาร Hydroquinone

ภาพที่ 2 โครงสร้างสาร Retinoic acid



เครื่องมือและวิธีการดังนี้

1. การเตรียมเฟสเคลื่อนที่: น้ำกลั่น และเมทานอล (methanol) คุณภาพระดับ HPLC นำมากรองผ่าน filters ขนาด 0.22 micron

2. การเตรียมสารมาตรฐาน

2.1 Stock standard 1000 ppm: ชั่งสารมาตรฐานไฮโดรควิโนน (hydroquinone), กรดเรทิโนอิก (retinoic acid) 0.0250 กรัมละลาย และปรับปริมาตรด้วย methanol ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร

2.2 Working standard: ปิเปต stock standard โดยเจือจางและปรับปริมาตรด้วย methanol ให้ได้สารละลายผสมที่ความเข้มข้น 2, 20, 40, 60, 80 100 และ 120 ppm ตามลำดับ

3. การเตรียมตัวอย่าง: ชั่งตัวอย่าง 1 – 2 กรัมใส่ลงในขวดวัดปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติม methanol นำไป sonicate 10 นาที ละลายและปรับปริมาตรด้วย methanol นำ สารละลายส่วนใส กรองผ่าน PTFE Filter 0.2 micron ใส่ในขวดสำหรับฉีด

4. สภาวะเครื่อง HPLC:

HPLC = Agilent Model 1100 series

Column = ODS C 18 250 x 4.6 mm , 5 or 10 μm

Injection = 5 μl, Temp = 35 °C

Detector = DAD 295, 353 nm

5. ขั้นตอนการทดสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบ[11]

5.1 การตรวจสอบค่า linearity และ range ของวิธีทดสอบ

ทดสอบ sample blank (เครื่องสำอาง) ที่เติมสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิกความเข้มข้น 2, 20, 40, 60, 80 และ 100 ppm ทำตามวิธีทดสอบความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ นำค่า peak area และค่าความเข้มข้นไปสร้างกราฟสัมพันธ์เพื่อศึกษาความเป็นเส้นตรง (linearity) โดยพิจารณาจากค่า Coefficient of determination (R^2)

5.2 การทดสอบความเที่ยง (precision)

ทดสอบความเที่ยงของวิธีทดสอบ (method repeatability) โดยการทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60 และ 80 ทำตามวิธีทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำค่า peak area ไปคำนวณหาค่า %recovery, %ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพันธ์ (relative standard deviation, %RSD)

5.3 การทดสอบความแม่นของการทดสอบ

ทดสอบ sample blank ที่เติมสารมาตรฐาน hydroquinone ความเข้มข้น10, 20, 40, 60 และ 80 ทำตามวิธีทดสอบความเข้มข้นละ 10 ซ้ำ นำค่า peak area คำนวณหา %recovery โดยค่าที่ได้ต้องอยู่ในช่วง 60 – 120%

5.4 การยืนยันค่า LOD (limit of detection) และค่า LOQ (limit of quantitation)

ทดสอบเพื่อยืนยันค่า LOD โดยเติมสารมาตรฐานไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิกความเข้มข้นต่ำสุดที่คำนวณได้ลงในตัวอย่าง sample blank (เครื่องสำอาง) จำนวน 10 ซ้ำ ทำตามวิธีทดสอบ ผลการทดสอบต้องให้สัญญาณของพีก ต้องมี signal/noise (S/N) ไม่ต่ำกว่า 3:1

ผลการศึกษา

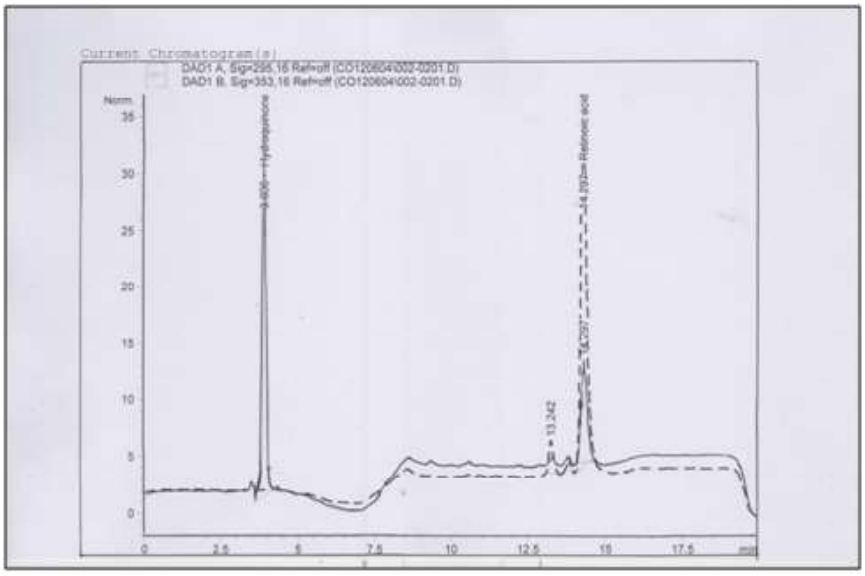
สามารถหาวิธีที่จะวิเคราะห์สารทั้งสองชนิดในคราวเดียวกันได้ โดยใช้เทคนิค HPLC โดยใช้เฟสคงที่เป็นคอลัมน์ ODS C18 ขนาด 4.6 x 250 mm เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำและเมทานอล สัดส่วนและอัตราไหลใช้ระบบเกรเดียน (ดังตารางที่ 1) ปริมาตรการฉีด 5 ไมโครลิตร ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงยูวีด้วยไดโอดอาร์เรย์ (diode array) ที่ 295 และ 353 นาโนเมตร

ตารางที่ 1 อัตราส่วนและอัตราการไหลของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase)

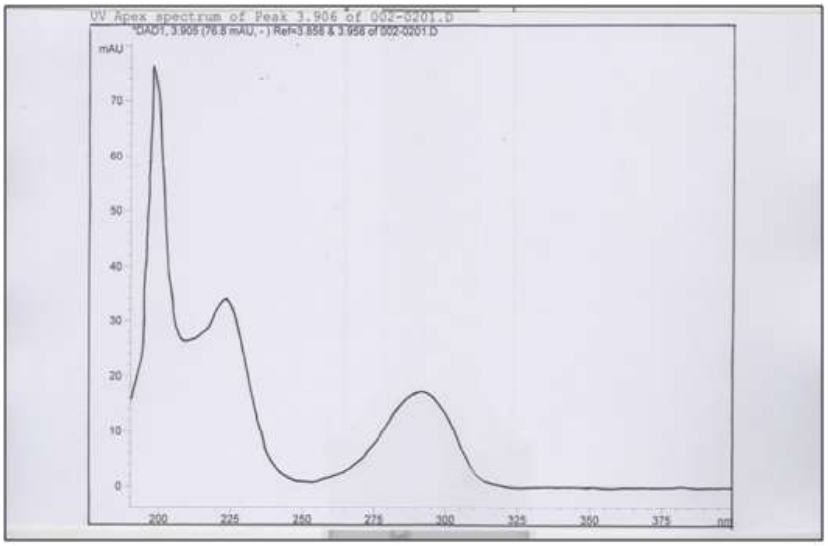
Time	%Methanol	%Water	Flow (ml/min)
0-4	55	45	0.8
7	90	10	1.4
14	90	10	1.4
16	55	45	0.8
17	55	45	0.8

สำหรับไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิกตามลำดับ ไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก แสดงกราฟออกมาที่เวลาประมาณ 4 และ 13 นาที ตามลำดับ (ดังภาพที่ 3-5) การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ พบว่า กราฟมาตรฐานในช่วงความเป็นเส้นตรงที่ความเข้มข้น 20 – 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r^2) เท่ากับ 0.999 (ดังภาพที่ 6-7) ขีดจำกัดต่ำสุดของการตรวจวัด (LOD) สำหรับไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก มีค่า 10 และ 20 นาโนกรัม ตามลำดับ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (%RSD) ของการทำซ้ำ มีค่าน้อยกว่า 2.00 ทั้งสองชนิด และร้อยละของการคืนกลับ (%recovery) ของสารไฮโดรควิโนนและกรดเรติโนอิก เท่ากับร้อยละ 79 - 87 และ 81-120 ตามลำดับ และเมื่อทำการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์สารตัวอย่างเดียวกัน โดยใช้วิธีมาตรฐานเดิมกับวิธีที่พัฒนานี้โดยใช้สถิติ F-Tests และ T-tests พบว่า

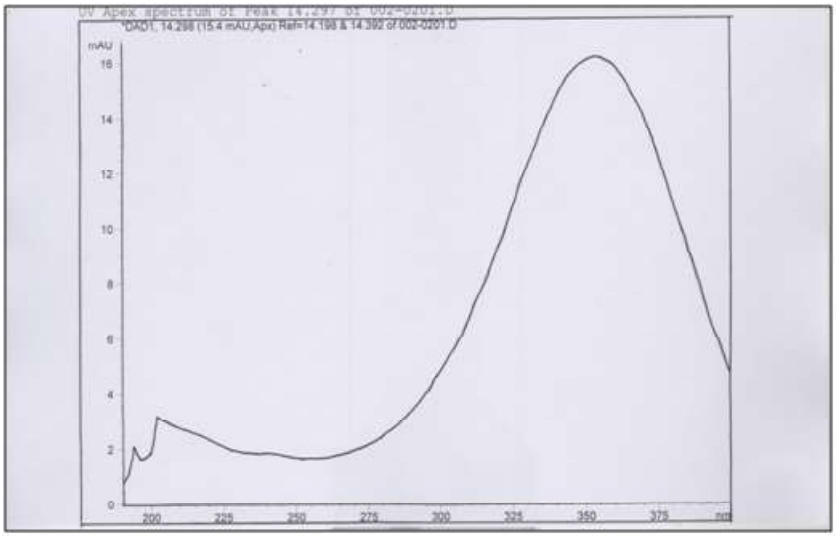
ภาพที่ 3 โครมาโทแกรมไฮโดรควิโนนและกรดเรทิโนอิก



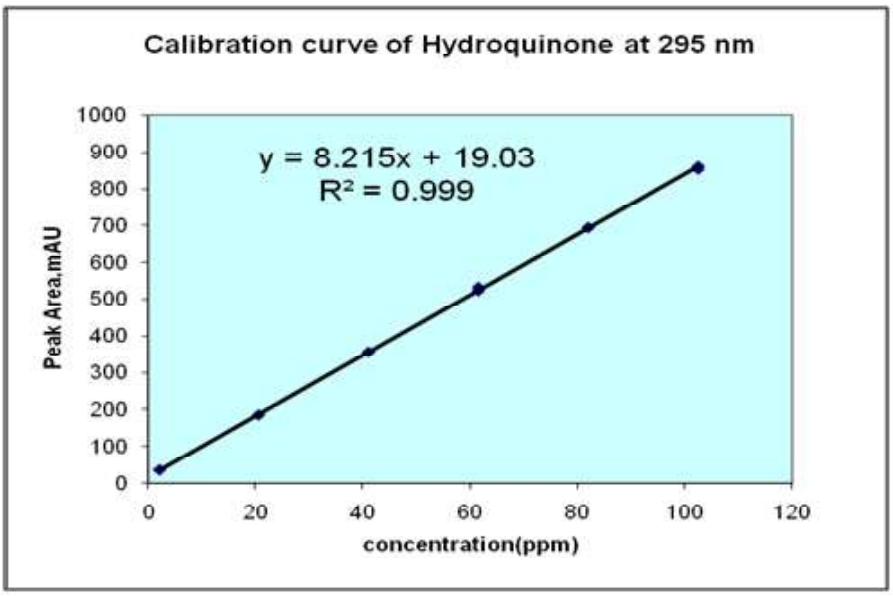
ภาพที่ 4 สเปคตรัมไฮโดรควิโนน



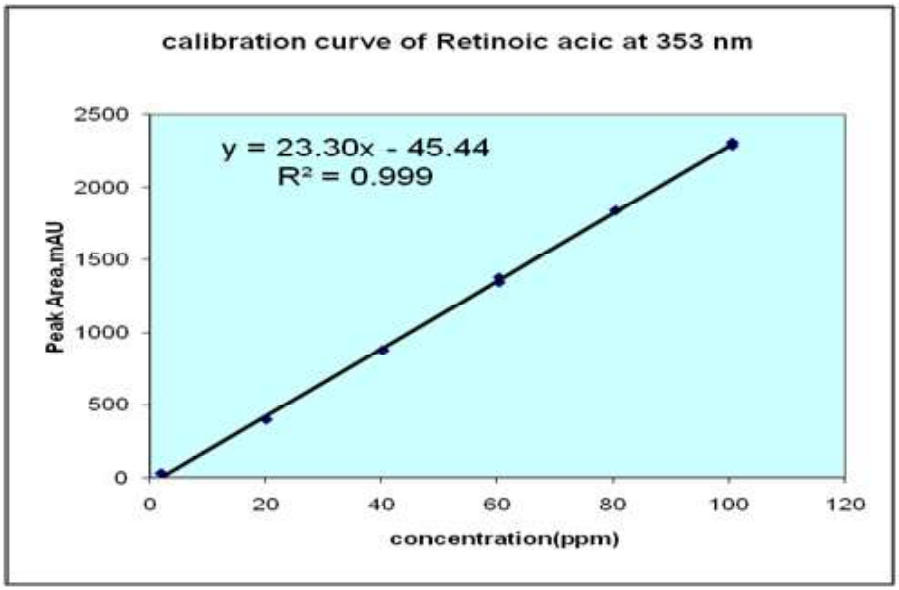
ภาพที่ 5 สเปคตรัมกรดเรทิโนอิก



ภาพที่ 6 Calibration curve of hydroquinone



ภาพที่ 7 Calibration curve of retinoic acid



วิธีวิเคราะห์นี้ไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญ

วิจารณ์

จากผลการศึกษาที่ได้พบว่าวิธีนี้สามารถวิเคราะห์แยกสารทั้งสองชนิดโดยให้ความถูกต้องทั้งด้านคุณภาพและปริมาณวิเคราะห์ ซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์จาก 2 วิธีเป็นทำในครั้งเดียว และงดการใช้กรดอะซิติกซึ่งเดิมเป็นสารชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ในการวิเคราะห์กรดเรทิโนอิกลง ซึ่งสารดังกล่าวทำให้เกิดการระคายเคืองเยื่อบุจมูกและส่งกลิ่นรบกวนผู้วิเคราะห์ เนื่องจากเครื่องสำอางมีการใช้สารหลายชนิดเป็นส่วนผสมขึ้นกับสูตรของแต่ละตำรับซึ่งอาจมีพีกของสารที่ออกมาในเวลาใกล้เคียงกัน ดังนั้นการวิเคราะห์สารดังกล่าวเพื่อให้สามารถยืนยันผลการวิเคราะห์ในคราวเดียวกันควรทำการวัดแบบสแกนสเปคตรัมในช่วงยูวี 230 – 400 nm และทำการเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานที่วิเคราะห์ในคราวเดียวกัน และเนื่องจากสารทั้งสองเป็นสารที่สลายตัวง่ายเมื่อโดนแสง ดังนั้นควรเตรียมใส่ขวดสีชาและกรณีต้องการวิเคราะห์ปริมาณควรเตรียมสารใหม่ทุกครั้ง กรณีที่สารไฮโดรควิโนนถูกชะออกมาอย่างรวดเร็วใกล้สารละลายตัวพา ให้ระมัดระวังโดยลดอัตราส่วนของเมทานอลลงหรือลดอัตราการไหลลงเล็กน้อยจะสามารถช่วยแยกได้ดี การวิเคราะห์ควรมีการใช้การ์ดคอลัมน์ทุกครั้งเพราะเครื่องสำอางมีสารผสมมากมายหลายชนิดที่สามารถทำให้คอลัมน์สกปรกง่าย การเตรียมตัวอย่างในวิธีนี้อาจไม่ใช่วิธีที่ดีเพราะสารที่สามารถละลายได้ในเมทานอลก็สามารถปนเปื้อนได้หมด ทำให้มีพีกมากมาย การเตรียมตัวอย่างที่จำเพาะเจาะจงจะช่วยให้ได้สารที่สะอาดและช่วยยืดอายุของคอลัมน์ที่ใช้งาน ดังนั้นการล้างและเก็บคอลัมน์ควรทำอย่างพิถีพิถันเพื่อรักษาอายุการใช้งาน วิธีการวิเคราะห์นี้ใช้ได้กับเครื่องสำอางที่มีสารห้ามใช้ดังกล่าวที่มีความเข้มข้นไม่น้อยกว่าร้อยละ 0.001 หากต่ำกว่านี้จะไม่สามารถวิเคราะห์ได้

สรุป

วิธีนี้สามารถนำไปใช้ตรวจวัดชนิดและปริมาณไฮโดรควิโนนและกรดเรติโนอิกในเครื่องสำอาง ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในคราวเดียวกันและให้ค่าที่ถูกต้องแม่นยำ และลดปัญหาในกรณีที่ตัวอย่างมีการใส่สารห้ามใช้ทั้งสองชนิดผสมกัน ใช้วิธีวิเคราะห์เพียงวิธีเดียว สามารถลดระยะเวลาในการวิเคราะห์ลงจากปกติ เช่น ถ้ามีตัวอย่าง 10 ตัวอย่างจะใช้เวลาวิเคราะห์ประมาณ 2 วัน แต่วิธีนี้จะใช้เวลาประมาณ 1 วันเท่านั้น และลดปริมาณเมทานอลและกรดอะซิติกที่ใช้เป็นเฟสเคลื่อนที่ลง และสามารถลดปัญหาการรบกวนจากการค้างในคอลัมน์ของกรดเรทิโนอิกเพราะถูกชะออกมาหมด วิธีนี้จึงเหมาะที่จะมาทดแทนวิธีดังกล่าวเพื่อช่วยลดการใช้สารเคมี อุปกรณ์ แรงงานและระยะเวลาในการวิเคราะห์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากผู้อำนวยการศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 7 ขอนแก่น ในการสร้างผลงานและงบประมาณในการนำเสนอผลงานสู่สาธารณะ และขอขอบคุณเพื่อนร่วมงานห้องปฏิบัติการงานยา กลุ่มงานคุ้มครองผู้บริโภคด้านสาธารณสุขที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจ

เอกสารอ้างอิง

1. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2551 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 125 ตอนพิเศษ 80 ง (ลงวันที่ 26 มีนาคม พ.ศ. 2551).
2. พระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535 ประกาศกระทรวงสาธารณสุข พ.ศ. 2551 ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่126 ตอนพิเศษ 46 ง (ลงวันที่ 27 มีนาคม 2552).
3. สุชิน สินไสวผล, สมพร สินไสวผล, อุดรจิตพยัค. การตรวจเอกลักษณ์และวิเคราะห์หาปริมาณสารห้ามใช้โดย HPLC ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางที่จำหน่ายในเขตพื้นที่ด่านชายแดนอำเภอแม่สาย จังหวัดเชียงราย. ใน: ศูนย์-วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 13. รายงานประจำปี 2554. เชียงราย: ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ 13; 2555. หน้า 25.

4. Siddique S, Parveen Z, Ali Z, Zaheer M. Qualitative and quantitative estimation of hydroquinone in skin whitening cosmetics. Journal of Cosmetic, Dermatological Sciences and Applications 2012; 2:224.
5. Shu T, Xue-fang X, Dan H. Determination of hydroquinone and phenol in cosmetic by HPLC. J Cosmet Sci 2009 ;60:485.
6. Desiderio C, Ossicini L, Fanali S. Analysis of hydroquinone and some of its ethers by using capillary electrochromatography. J Chromatography A 2000;887: 489-96.
7. Klvanova J, Brtko J. Selected retinoids: determination by isocratic normal phase HPLC. Endocrine regulations 2002; 36: 133-7.
8. Annesley T, Glacherio D , Wilkerson K. Analysis retinoids by high-performance liquid chromatography using programmed gradient separation. J Chromatography B 1984;305:199-203.
9. ASEAN. Identification and determination of hydroquinone in cosmetic products by TLC and HPLC [Internet]. [cited 2013 Oct 22]. Available from: http://www.asean.org/archive/MRA-Cosmetic/Doc-4.pdf
10. ASEAN. Identification and determination of retinoic acid (Tretinoin) in cosmetic products by TLC and HPLC. [Internet]. [cited 2013 Oct 22]. Available from: http://www.asean.org/archive/MRA-Cosmetic/Doc-1.pdf
11. ทิพวรรณ นิ่งน้อย. แนวทางปฏิบัติการทดสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ทางเคมีโดยห้องปฏิบัติการเดียว. นนทบุรี: กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข; 2549.

Abstract: Simultaneous Analysis of Hydroquinone and Retinoic Acid in Cosmetics by High Performance Liquid Chromatography

Peangjai wongsuwan, B.Sc. (Chemistry), M.Sc. (Analytical Chemistry)
Regional Medical Sciences Center 7, Khonkaen
Journal of Health Science 2014;23:362-8.

The objective of this study was to develop a laboratory method for simultaneous analysis of 2 substances, hydroquinone and retinoic acid, in cosmetics. Analytical separation technique using high performance liquid chromatography. The stationary phase was a column packing with octadodecyl silane, size 4.6 x 250 mm, particle size 5 micron. Mobile phase using gradient system was a mixture of water and methanol, injection volume 10 microliters , determination by UV absorption at 295 and 353 nm for hydroquinone and retinoic acid, chart out at about 4 and 13 minutes, respectively. The analysis showed that the standard curve was linear in the concentration range from 20 to 100 micrograms per milliter. The correlation coefficient (r^2) was 0.999. Limit of of detection for hydroquinone and retinoic acid were 10 and 20 ng, respectively; and the relative standard deviation (% RSD) of repeatability was less than 2.00. Thus, this method could be used to measure the types and amounts of hydroquinone and retinoic acid in cosmetic. These two substances could be analyzed at the same time with acceptable accuracy.

Key words: **high performance liquid chromatography, hydroquinone, retinoic acid**