医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法

横 山 敏 郎*, 森 謙一郎*, 中 村 義 昭*, 寺 島 潔*, 大 貫 奈穂美*, 荻 野 周 三*

Simultaneous Determination of UV Absorbents in Quasi-Drugs and Cosmetics

Toshiro YOKOYAMA*, Ken'ichiro MORI*, Yoshiaki NAKAMURA*, Kiyoshi TERAJIMA*, Nahomi OHNUKI* and Shuzo OGINO*

A method for the simultaneous determination of twelve UV absorbents in quasi-drugs and cosmetics was developed. The chemical name and abbreviations of the twelve UV absorbents are as follows, ethyl *p*-aminobenzoate (EAB), tetrahydroxybenzophenone (THB), ethoxyethyl *p*-methoxycinnamate (Cinoxate), dihydroxybenzophenone (DHB), dihydroxydimethoxybenzophenone (DHDMB), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (HMB), 2-ethylhexyl (Z)-4-(3,4-dimethoxybenzylidene)-2,5-dioxo-1-imidazolyzine propionate(EBP), 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate(EDB), 4-tert-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BMB), 2-ethylhexyl *p*-methoxy-cinnamate (EMC), 2-ethylhexyl salicylate (ES) and 2,2'-methylene-bis-[6-(2*H*-benzotriazole-2-yl) - 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)- phenol] (MBP).

A quasi-drugs or cosmetics sample of 1 g was weighed accurately, mixed with tetrahydrofurane(THF), dispersed by treatment in a supersonic water bath, and made up to 50 mL with THF. The solution was filtered through a 0.45 μ m membrane filter, and injected into on HPLC. Analytical conditions were as follows, column: TSK-GEL ODS-80TS (4.6 mm i.d. × 250 mm), column temperature: 40 \Box , mobil phase: gradient, THF: water (40:60) to (80:20), 1 ml/min, injection volume: 10 μ L, detector: UV 310 nm. By this method, the concentration of twelve UV absorbents in ten commercial products were determined with high precision and no cross-interference.

Keywords:紫外線吸収剤 UV absorbents, 医薬部外品 quasi-drugs, 化粧品 cosmetics, 同時分析 simultaneous determination

はじめに

オゾン層の破壊が原因で、紫外線の地表到達量が増加し、皮膚や目などに対する紫外線の有害性が問題となっており、近年様々な紫外線防御製品が市販されている。医薬部外品や化粧品には、紫外線による皮膚障害を予防する目的で紫外線吸収剤や、無機顔料等の物理的遮蔽剤が配合されている。紫外線吸収剤は皮膚障害を引き起こす可能性¹⁾があることから、薬事法に基づく化粧品基準により化粧品では配合上限が定められている。

著者らは皮膚障害等で苦情の多い²⁾ 医薬部外品および化粧品の安全性を確保するため、日頃からこれらの試験検査を行っている. 紫外線吸収剤については、池田らの報告³⁾ をはじめ、著者らも既に報告⁴⁾ しているが、新規物質の配合や分析機器の進歩等にともない、同時分析法の改良が長期的なテーマとなっている.

そこで、今回は化粧品の配合制限成分リスト(ポジティブリスト)に収載された紫外線吸収剤のうち汎用 11 種類と、昨年 10 月に新たにポジティブリストに収載された1種類を含めた同時分析法を検討したので報告する.

実 験 方 法

1. 標準試薬

分析対象とした紫外線吸収剤は以下のとおりである. パラアミノ安息香酸エチル (EAB) , テトラヒドロキシベンゾフェノン(THB), パラメトキシケイ皮酸エトキシエチル (Cinoxate) , ジヒドロキシベンゾフェノン(DHB), ジヒドロキシジメトキシベンゾフェノン(DHDMB), 2-ヒドロキシ-4-メトキシベンゾフェノン(HMB), (Z) -4-(3,4-ジメトキシベンジリデン)-2,5-ジオキソ-1-イミダゾリジンプロピオン酸 2-エチルヘキシル(EBP), パラジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシル(EDB), 4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン(BMD), パラメトキシケイ皮酸 2-エチルヘキシル(EMC), サリチル酸 2-エチルヘキシル(ES), 2,2'-メチレン-ビス-[6-(2H-ベンゾトリアゾル-2-イル)-4(1,1,3,3-テトラメチルブチル)-フェノール] (MBP).

なお、MBP はポジティブリスト新規収載物質である. これらの物質の構造式および化学名と略名を Fig.1 に示す. 標準試薬として、EAB, EMC, EDB, HMB, BMB は和光純 薬工業(株)製、THB, DHB, DHDMB は東京化成工業(株) 製、Cinoxate は国立医薬品食品衛生研究所標準試薬,

^{*} 東京都健康安全研究センター医薬品部微量分析研究科 169-0073 新宿区百人町 3-24-1

^{*} Tokyo Metropolitan Institute of Public Health 3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjyuku-ku, Tokyo, 169-0073 Japan

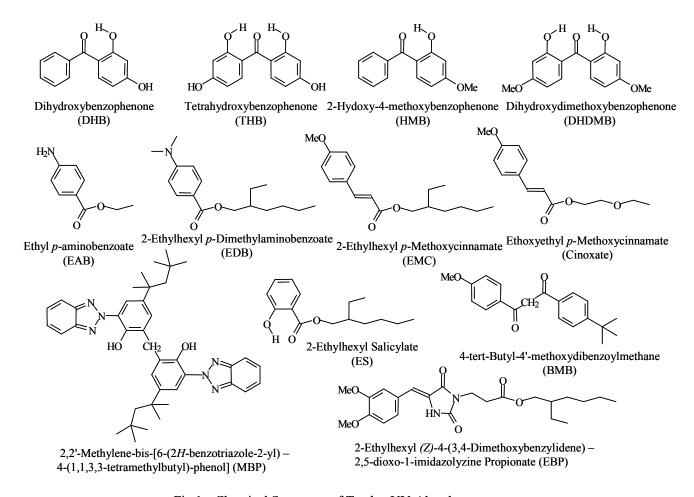


Fig.1. Chemical Structures of Twelve UV-Absorbents

EBP は味の素 (株) 製, **ES** は高級アルコール工業 (株) 製 を用いた.

MBP は純品が入手できないため、Ciba Specialty Chemicals (株) より供与された $TINOSORB^{TM}M$ から抽出精製した.

2. 試料溶液の調整

化粧品や医薬部外品の試料 0.4~g を 20~mL 試験管に精秤し、THF を加えて振とう後、超音波浴に 10~分間入れて十分溶解し、さらに THF を加えて全量を 20~mL とした.この溶液を 0.42~μm のメンブランフィルターでろ過し、ろ液を HPLC 用試験溶液とした.メンブランフィルターだけでは澄明化しない場合は、溶液を高速遠心分離(10000~rpm, 10~分)し、上澄液を HPLC 用の試料溶液とした.

3. 標準溶液の調整

12 種類の紫外線吸収剤の標準物質をそれぞれ約 125 mg を精密に秤取り、THF に溶解して正確に 50 mL とし、2500 μ g/mL の標準原液を作製した.この標準原液 12 種類をそれぞれ 2 mL ずつ取り、THF で正確に 50 mL として 100 μ g/mL の混合標準液を作製した. 同様に、THF で適宜希釈して 5 μ g/mL,10 μ g/mL,25 μ g/mL 及び 50 μ g/mL の標準系列を作製した.

4. HPLC 条件

装置:日本分光(株) 製 ガリバー PU-980 シリーズ, 検出器:フォトダイオードアレイ検出器 MD-915, UV-VIS 検出器 UV-970, カラム:(株) 東ソー製 TSKgel ODS-80Ts (4.6 mm i.d.×250 mm), 移動相:A 液 40%THF, B 液 80%THF, グラジエント条件:Table 1, カラム温度:40℃, 移動相流量:1 mL/min, 検出波長:310 nm, 注入量:20 μL

結果及び考察

1. MBP 標準品の調製

TINOSORBTMM 2.5 g にメタノールを加え, 超音波浴で分散し, 遠心分離して沈殿を得た. これをメタノールで同様に3回洗浄し, THF で溶解, ろ過後溶媒を留去して MBPの白色沈殿 1.2 g を得た.

精製品の純度を確認するため、 1 H-NMR および 13 C-NMR の測定を行った.結果は以下のとおりであり,全シグナルは MBP 由来のものだけであった.

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ : 0.70 (18H, s), 1.39 (12H, s), 1.73 (4H, s), 4.30 (2H, s), 7.36 (2H, d, J=2.3 Hz), 7.46 (4H, dd, J=6.9, 2.7 Hz), 7.93 (4H, dd, J=6.9, 2.9 Hz), 8.29 (2H, d, J=2.3 Hz), 11.53 (2H, s)

¹³C-NMR (CDCl₃, 125.8 MHz) δ: 30.91, 31.70, 31.84, 32.34, 38.21, 56.64, 116.68, 117.63, 124.48, 127.43, 129.35, 129.92,

141.36, 142.75, 145.68

また,精製品の分子吸光係数を測定したところ,305 nm (ε30600) および,348 nm (ε31300) と,他の紫外線吸収剤と比べて十分な値であることや,後述のHPLCでピークの重複がないことなどを確認し,この精製品をMBPの標準品として使用することにした.

2. 分析条件の検討

1) 検出波長の検討

検出器は、フォトダイオードアレイ検出器で妨害物質等の影響を確認した後、検出感度の高い UV-VIS 検出器を用い、単一波長による検出方法を検討した. 各成分の UV 吸収スペクトルを分光光度計により測定した結果を Fig.2 に示した. それぞれがバランス良く検出できる波長として、310 nm を選択した.

2) カラムおよび移動相の検討

カラムについては、汎用の ODS カラムを用い、150 及び 250 mm 長のものについて 12 種類の紫外線吸収剤の分離を 比較してみた. 結果は、それぞれの保持時間は大きく変化 がなかったものの、250 mm の方が各ピークの分離が良好であったため、これを用いることにした

移動相は、12種類すべてを溶解できる溶媒を選択することとし、溶媒にもっとも難溶な MBP が THF かクロロホルムに比較的易溶であることから、THF を移動相溶媒として用い、THF・水系の移動相を検討した。

3) グラジエント条件の検討

THF-水 (4:6) のアイソクラティックな条件では, EAB, THB, CINOXATE, DHB, DHDMB 及び HMB の 6 成分は 30 分以内に分離できたものの, 他の 6 成分は溶出にきわめて

長時間を要した.特に、MBPは最終的に全く溶出しなかった

次に、THF-水 (8:2) では、12 種類すべてが溶出したものの、CINOXATE、DHB、DHDMB が分離できず、EDB、BMB、EMC も完全に分離できなかった.

以上の結果から、紫外線吸収剤 12 種類を同時分析する には、アイソクラティックな条件では困難であると考え、 グラジエント条件について検討した.

先ず THF-水 (4:6) [移動相 A] と THF-水 (8:2) [移動相 B] を用いたステップワイズグラジエントを検討した. EAB, THB, CINOXATE, DHB, DHDMB 及び HMB を移動相 A で溶出させ, 17 分後に移動相 B に切り換え, 残り 6 成分を分離溶出した.

しかし、この条件では、ベースの乱れが大きく、近接するピークの分離が不完全であることがわかり、次にリニアグラジエント法を検討した。

その結果,単純なリニアグラジエント法ではピークの分離がまだ十分でないため, Table 1 に示した多段グラジエント法を検討した. その結果, Fig.3 に示したように, 35分以内に12種類すべてを良好に分離することができた.

Table 1. Gradient Condition of Mobile Phase

Time(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
17	75	25
27	0	100
30	0	100
31	100	0
35	100	0

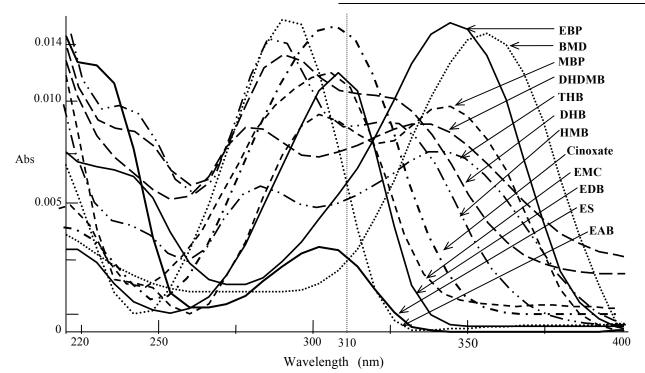


Fig.2. UV Spectra of Twelve UV-Absorbents

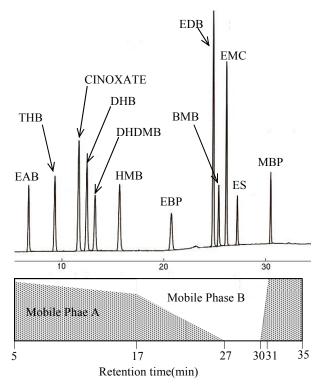


Fig.3. HPLC Chromatograms of Twelve UV-Absorbents and Gradient Elution

3. クロマトグラムの再現性確認と検量線の作成

本法によるクロマトグラムの再現性を確認するために、同一の混合標準溶液を本分析条件で5回測定した。その結果、Table2に示したように各成分ともクロマトグラムの保持時間およびピーク面積の再現性は良好であった。

Table 2. Reproducibility of HPLC Chromatograms for Twelve UV-Absorbents

	RT	RT RSD(%)	Area RSD(%)
EAB	6.98	2.30	1.11
THB	9.45	1.34	2.35
CINOXATE	12.10	1.11	0.78
DHB	12.69	1.37	2.22
DHDMB	13.67	1.04	1.78
HMB	16.19	0.82	0.96
EBP	20.91	0.99	1.02
EDB	24.43	0.70	2.35
BMD	24.92	0.90	1.41
EMC	25.72	0.81	0.97
ES	26.96	0.49	0.43
MBP	31.17	0.49	0.75
			n=5

検量線は、各成分について 5 、10 、25 、50 、100 µg/mL の 5 点をとり作成した。その結果、Fig.4 に示すように各成分とも検量線の相関係数 R^2 は $0.9976 \sim 0.9998$ ときわめて良好な 1 次回帰を示した。

しかし、EDB と、ES では検出感度に 6 倍の差が認められた.これは単一波長で 12 成分を検出しようとしたためであり、実際に試料を分析する上では特に支障はないものと考えられた.

4. 妨害物質の影響

実際に著者らが医薬部外品や化粧品の試験を行う場合, 夾雑物をすべて除去して,紫外線吸収剤のみを分析することは不可能である.そこで,医薬部外品や化粧品中の紫外 線吸収剤を分析する際の,他の成分による妨害についても 検討した.

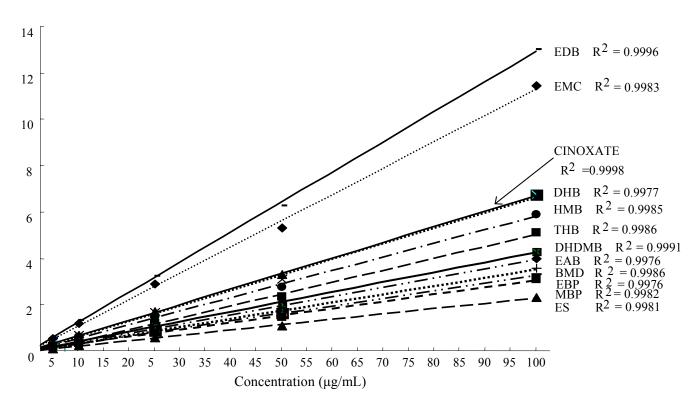


Fig.4. UV Spectra of Twelve UV-Absorbents

具体的には、本分析条件において、比較的汎用されているパラベン類や他の防腐剤等の妨害があるか確認した.

対象は、保存・防カビ剤として配合されるパラベン類 6 種類 (メチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、イソプロピルパラベン、ブチルパラベン、イソブチルパラベン) および、サリチル酸、安息香酸、デヒドロ酢酸、ソルビン酸、フェノキシエタノール、イソプロピルメチルフェノール、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソールの 14 物質について検討した。その結果、Fig. 5 に示したように、デヒドロ酢酸 (DHA) が EAB に近接するが、良好に分離することがわかった。

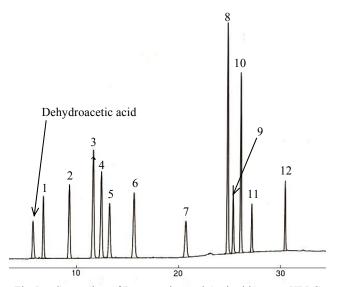


Fig.5. Separation of Preservative and Antioxidants on HPLC Chromatograms of Twelve UV-Absorbents
1. EAB, 2. THB, 3. CINOXATE, 4. DHB, 5. DHDMB
6. HMB 7. EBP 8. EDB 9. BMB 10. EMC 11. ES
12. MBP

その他, サリチル酸と EAB も近接したが, Rt 1.5 分差で デヒドロ酢酸より前に現れ良好に分離した. 他の物質については, 本法で得られるクロマトグラム上には全く検出されなかった. したがって, 本法へのこれら 14 物質の影響はないものと判断できた.

5. 添加回収実験

紫外線吸収剤の製品中における配合上限濃度は、化粧品基準により、粘膜に使用されることがない化粧品で $3\sim20\%$ となっている5). そこで、今回対象とした 12 種類を市販の乳液およびクリームに 5%添加し、添加回収実験を行った。その結果、Table <math>3 に示したように、乳液での回収率は $90.33\sim99.51\%$ 、相対標準偏差(RSD) $1.04\sim3.96\%$ 、クリームでは回収率 $100.57\sim109.36\%$ 、相対標準偏差(RSD) $1.04\sim3.99\%$ となり、ほぼ満足できる結果となった.

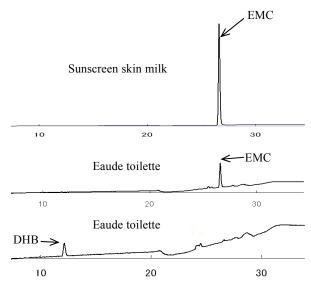


Fig.6. HPLC Chromatograms of Commercial Products

Table 3. Recovery of Twelve UV-Absorbents Spiked to Skin Milk and Cream at 5 Percent

	Milk Recovery(%)			Cream		
				Recovery(%)		
	of mean	SD	RSD(%)	of mean	SD	RSD(%)
EAB	90.33	2.09	2.31	109.17	2.39	2.19
THB	92.65	2.47	2.67	109.35	2.53	2.31
CINOXATE	96.86	1.99	2.05	104.63	1.47	1.41
DHB	93.42	2.91	3.12	107.12	3.41	3.19
DHDMB	94.18	3.73	3.96	106.31	4.24	3.99
HMB	93.50	2.42	2.59	107.01	2.79	2.61
EBP	92.37	0.96	1.04	108.27	1.12	1.04
EDB	91.47	1.92	2.10	109.36	2.25	2.05
BMD	93.63	1.23	1.32	106.82	1.41	1.32
EMC	99.51	3.17	3.19	100.57	3.24	3.23
EAB	92.83	2.27	2.45	109.31	2.26	2.07
MBP	92.68	2.72	2.94	107.98	3.14	2.91

6. 本法による市販製品の試験結果

本法による市販製品(日焼け止め乳液及びオードトワレ)の試験結果の例を Fig.6 に示した. 試料は市販製品を THF に溶解し, $0.42~\mu m$ のメンブランフィルターでろ過した後, そのまま HPLC 用試料とした.

クロマトグラムの例に示したように,簡単な前処理で, 夾雑物の影響を受けずに分析することができた.

まとめ

2 液高圧グラジエント HPLC 法により, 12 種類の紫外線吸収剤について同時分析法を確立することができた.

1 サイクルの分析時間は 35 分で、クロマトグラムの分離状態や再現性、添加回収についても良好な結果を得た. 各紫外線吸収剤の検出限界は、 $0.4\sim2~\mu g/mL$ であり、 $1\sim100~\mu g/mL$ の検量線の相関も良好であった.

新規紫外線吸収剤である MBP については, Ciba Specialty Chemicals 社製の TINOSORB TM M を用いて精製, 分析を試みた. その結果, 他の 11 物質と同時に分析できることが確認できた.

謝 辞 新規紫外線吸収剤である MBP の市販品がなかったため、本研究を行うにあたり、TINOSORBTMM を分与していただきました Ciba Specialty Chemicals 社に深く感謝の意を表します.

文 献

- 1) T.M.Hughes, J.A.Martin, V.J.Lewis and N.M.Stone: Contact Dermatitis, **52**, 226-227, 2005.
- 2) 国民生活センター編:消費生活年報 2000, 79-87 Kazuo
- 3) Kazuo Ikeda, Sukeji Suzuki, Yohya Watanabe: J.Chromatography, 482, 240-245, 1989.
- 4) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 他: 東京衛研年報, **50**, 65-69, 1999.
- 5) 日湯浅正治,宇山侊男:全成分表示に対応した化粧品成 分ガイド 第3版,2004,フレグランスジャーナル社, 東京.
- 6) 東京本公定書協会編: 化粧品原料基準, 第二版注解 I, 1984, 薬事日報社, 東京.
- 7) 厚生省薬務局審査課監修: 医薬部外品原料規格, 1991, 薬事日報社, 東京.