

医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法についての改良

横山 敏郎*, 森 謙一郎*, 中村 義昭*, 寺島 潔*,
大貫 奈穂美*, 宮本 道子*, 荻野 周三*, 斉藤 和夫*

Improvement Simultaneous Determination of UV Absorbents in Quasi-Drugs and Cosmetics

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

Improvement of the simultaneous determination of UV absorbents in quasi-drugs and cosmetics was examined. The chemical names and abbreviations of 13 UV absorbents are as follows: tetrahydroxybenzophenone (THB), ethyl *p*-aminobenzoate (EAB), dihydroxy-benzophenone (DHB), dihydroxydimethoxybenzophenone (DHDMB), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (HMB), 2-ethylhexyl (*Z*)-4-(3,4-dimethoxybenzylidene) - 2,5-dioxo-1-imidazolizine propionate (EBP), 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoyl-methane (BMB), 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate (EDB), 2-ethylhexyl *p*-methoxy-cinnamate (EMC), 2-ethylhexyl salicylate (EHS), 2-ethylhexyl 2-cyano-3,3-diphenylacrylate(ECA), 2,4,6-tris[4-(2-ethylhexyloxycarbonyl)-anilino]-1,3,5-triazine (TEAT), 2,2'-methylene-bis-[6-(2*H*-benzotriazole-2-yl) - 4-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenol] (MBP).

A quasi-drug or cosmetic sample of 0.4 g was weighed accurately, mixed with 4 mL of tetrahydrofuran (THF) and 6 mL of acetonitril, dispersed by supersonic, made up to 20 mL with acetonitril. The solution was filtered using a 0.45 μ m membrane filter, and injected into HPLC. Analytical conditions of HPLC were as follows, column: ZORBAX SB-C8 (4.6 mm i.d. \times 150 mm), 40°C, mobile phase: gradient, acetonitril, water (0.2% formic acid) (40:60) to (100:0), 0.5 mL/min, injection volume 2 μ L, detector UV 310 nm. By this method, 13 of UV absorbents in 10 commercial products were determined with high precision and no 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

近年皮膚などに対する紫外線防御意識の高まりを背景に、様々なサンプロテクト製品が販売されている。サンプロテクト製品としての医薬部外品や化粧品には、様々な紫外線吸収剤や無機顔料等の物理的遮へい剤が配合されている。サンプロテクトを標榜していない製品でも紫外線吸収剤を配合しているものもあり、中には紫外線による製品自体の劣化を防止する目的で紫外線吸収剤を配合している製品もある。紫外線吸収剤はかぶれなどの皮膚障害を誘引する可能性があることから¹⁾、化粧品の場合、薬事法にもとづき、化粧品基準により配合上限が定められている。

著者らは医薬部外品及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。紫外線吸収剤の同時分析法については、池田らの報告²⁾をはじめ、著者らも既に報告^{3,4)}している。しかしながら、今後も新規物質が次々と開発されることが予想され、それに伴い、検査対象となる紫外線吸収剤の種類も増加すると思われることから、同時分析法の改良が長期的なテーマとなっている。

前報⁴⁾では化粧品の配合制限成分リスト(ポジティブリスト)に記載された紫外線吸収剤のうち、12種の成分につ

いての同時分析法を報告した。今回はそのうち、使用頻度が極めて低くなったパラメトキシケイ皮酸エトキシエチル(Cinoxate)を除き、新たに2-シアノ-3,3-ジフェニルアクリル酸2-エチルヘキシル(オクトクリレン ECA)と2,4,6-トリス[4-(2-エチルヘキシルオキシカルボニル)アニリノ]-1,3,5-トリアジン(オクチルトリアジン TEAT)を加えた。さらに、前報⁴⁾で移動相に使用したTHFが、HPLCの配管に使用しているPEEKチューブを劣化させることなどから、これをアセトニトリルに変え、13種類の成分について同時分析法を検討したので改良法として報告する。

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。テトラヒドロキシベンゾフェノン(THB)、パラアミノ安息香酸エチル(EAB)、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)、4-*tert*-ブチル-4'-メトキ

* 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 東京都新宿区百人町 3-24-1

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

シジベンゾイルメタン(BMD), パラジメチルアミノ安息香酸 2-エチルヘキシル(EDB), 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(ESA), オクトクリレン(ECA), オクチトリアゾン(TEAT), 2,2'-メチレン-ビス-[6-(2*H*-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).

これらの物質の構造式及び化学名と略名を 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, EBP は味の素 (株) 製, EHS は高級アルコール工業 (株) 製を用い, ECA 及び TEAT は BASF 社製試薬を用いた. MBP は純品が入手できないため, 前報⁴⁾と同様に, チバ・スペシャルティ・ケミカルズ (株) 供与の TINOSORB™M から抽出精製した.

2. 試験溶液の調製

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, TEAT や MBP などの難溶性成分を溶解するために THF を 4 mL 加え, さらにアセトニトリルを 6 mL 加えて振とう

後, 超音波浴に 10 分間入れて十分溶解し, さらにアセトニトリルを加えて全量を 20 mL とした. この溶液を 0.45 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清化しない場合は, 溶液を高速遠心分離(10,000 rpm, 10 分間)し, 上澄液を HPLC 用の試料溶液とした.

3. 標準溶液の調整

MBP を除く各紫外線吸収剤の標準物質をそれぞれ約 125 mg 精密に秤取り, アセトニトリルに溶解して正確に 50 mL とし, 2,500 μg/mL の標準原液を作製した. MBP はアセトニトリルに難溶のため, THF 溶液とした. これらの標準原液 13 種類をそれぞれ 2 mL ずつ取り, アセトニトリルで正確に 50 mL とし 100 μg/mL の混合標準液を作製した. これをアセトニトリルで適宜希釈して 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL 及び 200 μg/mL の標準系列を作製した. 前報⁴⁾では, 50 μg/mL までの検量線を作成したが, 実際の試料では紫外線吸収剤の配合量は比較的高濃度であるため, 検量線の範囲を高濃度側に広げた.

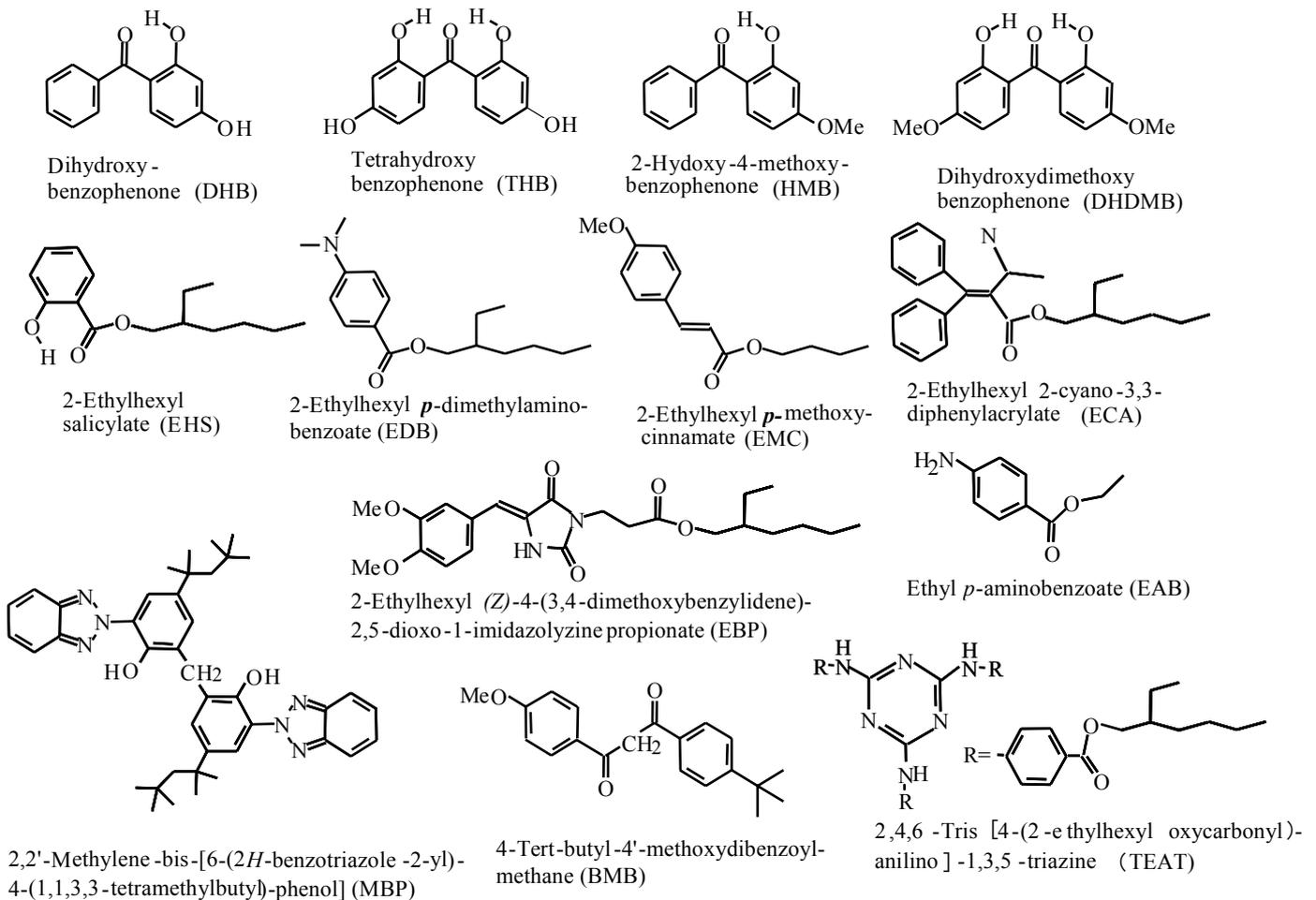


Fig.1. Chemical Structures of 13 UV-Absorbents

4. HPLC 条件

装置：日本分光（株）製 LC-2000Plus シリーズ，検出器：フォトダイオードアレイ検出器 MD-2015Plus，カラム：Agilent Technologies 社製 ZORBAX SB-C8（4.6 mm i.d.×150 mm），移動相：A 液 アセトニトリル，B 液 0.2%ギ酸，グラジエント条件：Table 1，カラム温度：40℃，移動相流量：0.5 mL/min，検出波長：310 nm，注入量：2 μL

結果及び考察

1. 分析条件の検討

1) 検出波長の検討

前報⁴⁾では検出器にフォトダイオードアレイ検出器と UV-VIS 検出器を用いたが，本報ではフォトダイオードアレイ検出器 MD-2015Plus の検出感度が高いことから，この検出器のみで測定することとした．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．その結果，前報⁴⁾と同じく，各成分を比較的近い感度で検出できる波長として 310 nm を選択した．

C18 カラムの場合，後半に溶出する TEAT 及び MBP の溶出が非常に遅く，また，150mm 長と 250 mm 長の比較では，各成分の相対保持時間は大きく変化せず，250mm 長の場合は全体的に溶出時間が遅いため，測定に長時間を要した．また，C18 カラムでは中間付近に溶出する BMB,EDB, EMC 及び EHS の 4 成分を分離することが困難であった．これはカラムの選定だけでなく，後述するグラジエント条件や送液量も大きく影響していた．最終的に，この 4 成分が最も良好に分離できた Agilent Technologies 社製 ZORBAX SB-C8（4.6 mm i.d.×150 mm）を選択した．

前報⁴⁾では移動相に THF・水系を用いたが，THF が HPLC の配管に使用されている PEEK チューブを劣化させることが確かめられたことから，本報では別の溶媒系について検討した．その結果，比較的各成分の溶解性が良く，カラム圧が上がりにくいアセトニトリル・水系を選択し，ギ酸を加え，酸性にして用いた．

3) グラジエント条件の検討

移動相 A をアセトニトリル，移動相 B を 0.2%ギ酸とし，まず，A 65%，B35%のアイソクラティックな条件で測定したところ，ECA までの 11 成分は 60 分以内に溶出し，分離するものの，TEAT と MBP は溶出せず，一方，THB, EAB, DHB, DHDMB, HMB, EBP の 6 成分はいずれも 10 分以内にピークが近接した状態で溶出した．

2) カラム及び移動相の検討

カラムについては，汎用の C18カラム及びC8カラムを用い，150及び250 mm長のものについて，13種類の紫外線吸収剤の分離状態を比較した．

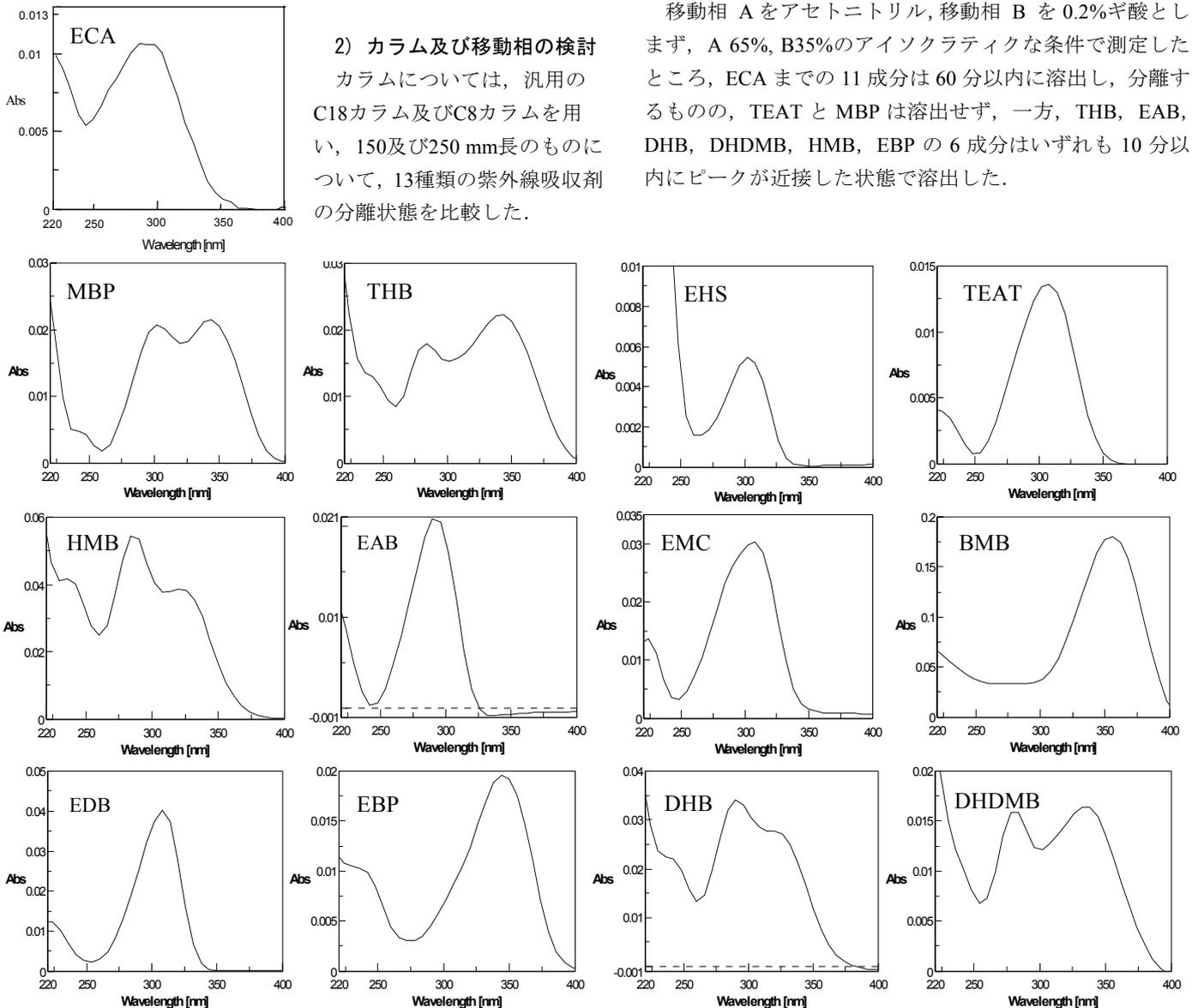


Fig.2. UV Spectra of 13 UV Absorbents

そこで、移動相 A, B 間の組成に濃度勾配をつけたグラジエント法について、以下に述べる検討を行った。

TEAT と MBP は、A を 100% にすることで溶出することが確かめられた。ECA 溶出後、すみやかに A を 100% の状態にした場合、分析時間を短縮できる反面、ベースラインが丘状にドリフトすることから、5 分程度かけて 65~100% に変化させることとした。

前半に溶出する THB, EAB, DHB, DHDMB, HMB, EBP の 6 成分については、A を分析開始時は 40% とし、65% へと上げることで分離が良くなることが確かめられた。ただし、A の濃度上昇が緩慢な場合には 6 成分の分離は良くなる反面、BMB と EDB の分離が悪くなった。

そこで、分析開始時の移動相 A の濃度を 40% とし、5 分間で 65% まで上げ、30 分まで保持した後、35 分で移動相 A を 100% にした。

TEAT と MBP は移動相 A が 100% になった後、約 15 分経過しないと溶出しないため、測定時間を短縮するためには、なるべく早く A を 100% にすれば良いが、EMC や EHS の溶出前に移動相 A の濃度を 100% に上げた場合には EDB, EMC, EHS の分離が不完全であった。以上の点を踏まえ、最終的に Table 1 に示すグラジエント条件を選択した。

移動相の流量を 1 mL/min とした場合、全成分が溶出するのに要する時間は約 30 分であった。0.5 mL/min では、ほぼ 2 倍の 55 分を要したが、BMB, EDB, EMC, EHS の 4 成分の分離は、より良好であった。さらに、カラムにかかる圧力が大幅に減ることから、カラムを含め HPLC 装置全体の負荷を低減できることから、移動相の流量は 0.5 mL/min とした。

なお、このグラジエント条件では、13 成分が溶出後、カラム洗浄と次の分析のためのコンディショニングのため、約 15 分程度の安定時間をとった。

この結果、Fig.3 に示したように、55 分以内に 13 種類すべての成分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	40	60
5	65	35
30	65	35
35	100	0
60	100	0
61	40	60
70	40	60

2. 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、Table 2 に示したように各成分とも、クロマトグラムの保持時間及びピーク面積の再現性は極めて良好であった。

各成分について 25, 50, 100, 200 µg/mL の 4 点を取り、検量線を作成した。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 0.9938~0.9999 ときわめて良好な 1 次回帰を示した。

EDB と EHS では検出感度に 16 倍の差が認められた。これは 13 成分の検出を単一波長で行ったためであるが、実際に試料を分析する上で特に支障はないものと考えられる。

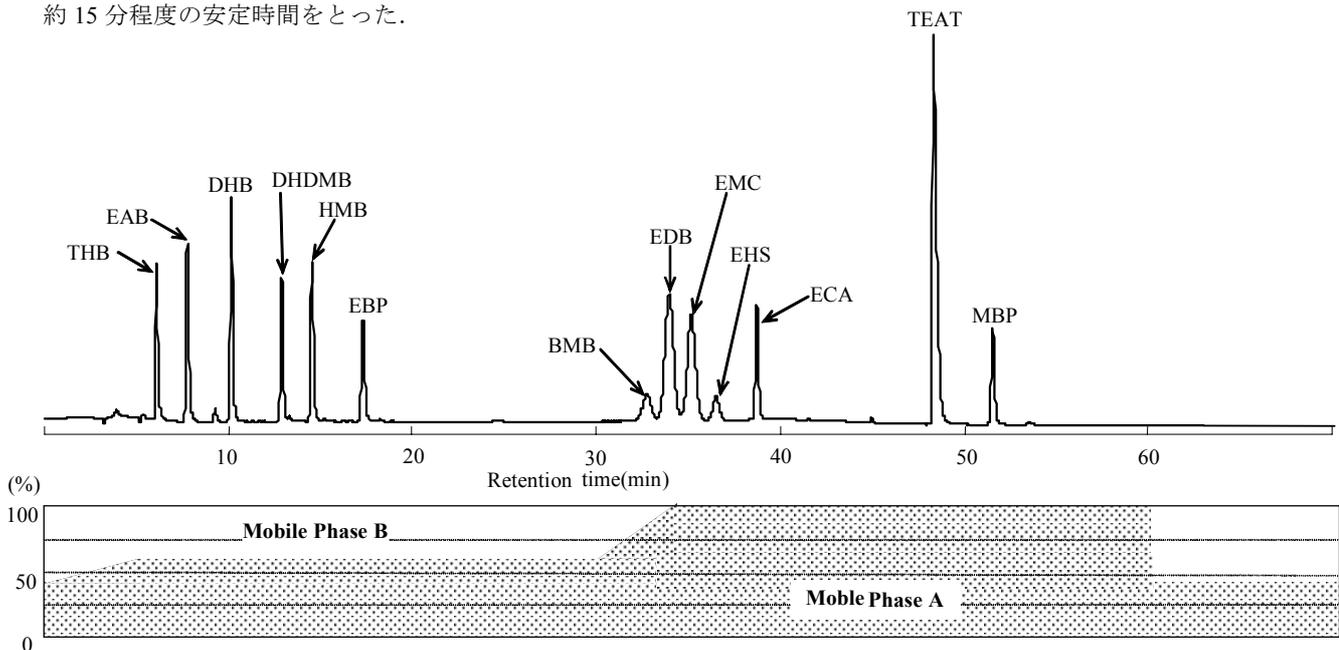


Fig.3. HPLC Chromatogram of 13 UV Absorbents and Gradient Elution

Table 2. Reproducibility of HPLC Chromatograms

UV Abs.	Rt	RT RSD (%)	Area RSD (%)
THB	6.120	0.22	0.67
EAB	7.800	0.00	0.86
DHB	10.173	0.10	0.63
DHDMB	12.907	0.00	0.65
HMB	14.560	0.06	0.45
EBP	17.333	0.06	0.81
BMB	32.773	0.00	0.62
EDB	33.973	0.03	0.45
EMC	35.187	0.90	1.51
EHS	36.520	0.80	0.85
ECA	38.733	0.81	0.86
TEAT	48.347	0.49	0.63
MBP	51.560	0.49	0.56

n=5

3. 妨害物質の影響

本法を医薬部外品及び化粧品の試験に適用するにあたり、夾雑物をすべて除去することは困難である。そこで、医薬部外品と化粧品の汎用成分が本法に及ぼす妨害について検討した。検討の対象とした物質は、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）及びサリチル酸、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物質である。

デヒドロ酢酸とサリチル酸のピークが THB と DHB の間に出現したが、THB、EAB 及び DHB とは十分に分離しており、他の物質はクロマトグラム上に現れてこないことから、上記の14物質は本法を妨害しないことが確かめられた。

4. 添加回収実験

化粧品基準は粘膜に使用されないことがない化粧品への紫外線吸収剤の配合上限濃度を3~20%と規定している⁵⁾。そこで、今回対象とした13種類の紫外線吸収剤を市販の乳液及びヘアーストに5%濃度となるよう添加し、添加回収試験を行った。その結果、Table 3に示すように、乳液での回収率は90.3~99.5%、相対標準偏差(RSD)1.04~3.96%、ヘアーストでは回収率100.6~109.4%、相対標準偏差(RSD)1.04~3.99%と、良好な結果を得た。

5. 市販製品の試験

本法を用いて試験した市販製品10種のうち、リップクリーム、日焼け止め乳液及びヘアーストのクロマトグラムをFig.5に示した。結果は、リップクリームからEMCのみが検出され、日焼け止め乳液ではBMB、EMC、TEAT、MBPの4種の紫外線吸収剤が検出された。また、ヘアーストからはBMBとEMCが検出され、得られたクロマトグラムから、本法が夾雑物の影響を受けずに13種類の紫外線吸収剤を分析できることが確かめられた。

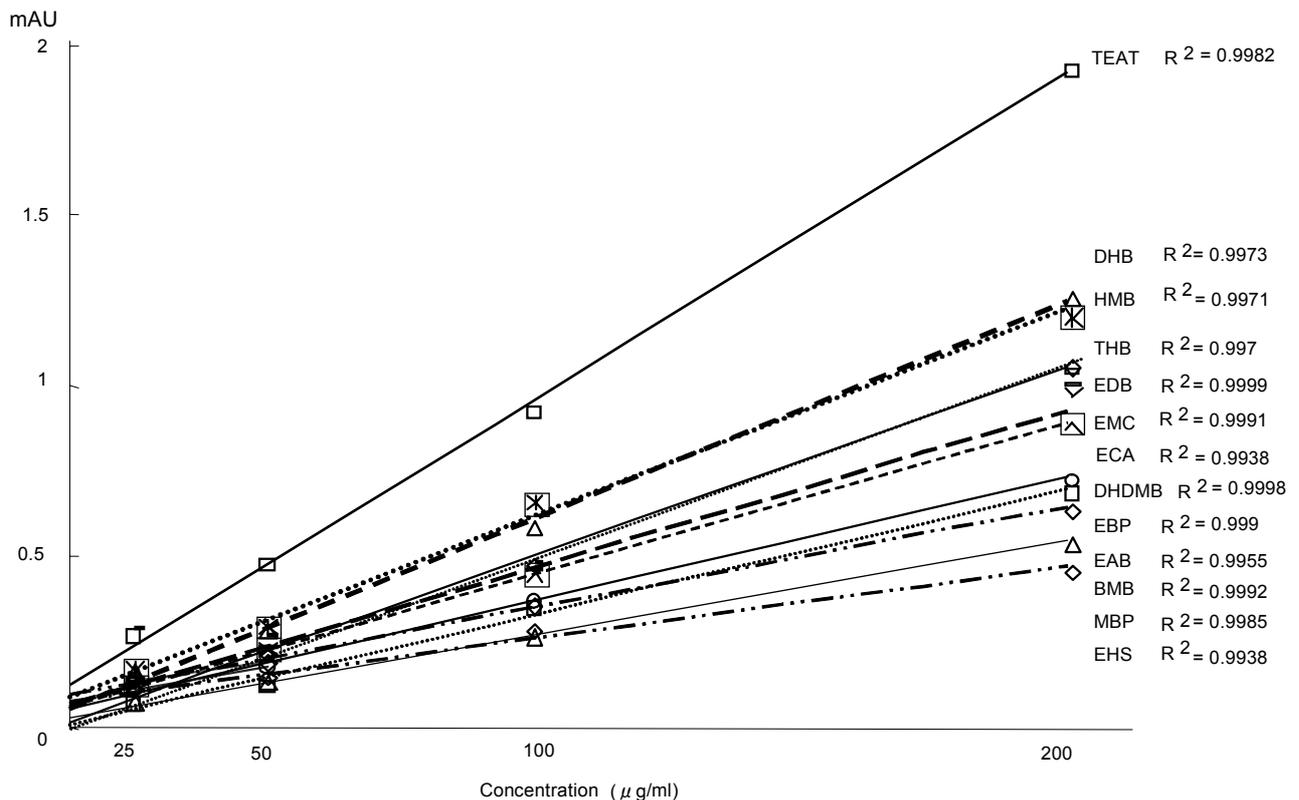


Fig.4. Standard Curves of 13 UV Absorbents

Table 3. Recovery of 13 UV Absorbents Added to Skin Milk and Hair Mist at 5%

	Skin milk			Hair mist		
	Recovery of mean (%)	SD	RSD(%)	Recovery of mean (%)	SD	RSD(%)
THB	92.4	2.91	2.10	109.4	2.79	2.31
EAB	92.7	2.42	1.32	104.3	2.25	2.61
DHB	96.9	3.73	3.96	104.6	2.39	1.04
DHDMB	93.4	1.99	2.59	109.4	1.47	3.19
HMB	94.2	2.47	1.04	107.1	3.41	2.05
EBP	93.5	1.92	2.31	106.3	4.24	3.23
BMB	93.6	2.09	2.94	108.3	2.25	3.99
EDB	91.5	0.96	2.67	109.4	1.41	2.07
EMC	99.5	3.17	1.26	106.8	2.26	1.41
EHS	92.8	1.23	2.62	100.3	3.24	2.45
ECA	92.5	2.27	2.05	100.6	2.16	2.12
TEAT	93.8	1.73	3.12	109.3	2.65	2.62
MBP	90.3	2.46	2.59	101.5	2.78	1.68

n=5

まとめ

前報で検討した 12 種類の紫外線吸収剤のうち、汎用されなくなった Cinoxate を除き、代わりに、新たにポジティブリストに掲載され、わが国でも配合されるようになった ECA と TEAT を加えた 13 種類の紫外線吸収剤について同時分析法を確立した。

HPLC の配管材料として一般的な PEEK チューブを劣化する THF を移動相に使用せず、カラム圧も低く抑えられるアセトニトリルに変更することで、カラムへの負荷の低減化が図れた。

本法はクロマトグラムのピーク分離状態、再現性及び添加回収率のいずれも良好で、医薬部外品及び化粧品に汎用される配合成分による妨害も認めなかった。

なお、各紫外線吸収剤の検出限界は、0.4~2 µg/mL であり、検量線は 1~200 µg/mL の範囲で良好な直線性を示した。

文献

- 1) T.M.Hughes, J.A.Martin, V.J.Lewis and N.M.Stone : Contact Dermatitis, **52**, 226-227, 2005.
- 2) Kazuo Ikeda, Sukeji Suzuki, Yohya Watanabe : *J.Chromatography*, **482**, 240-245, 1989.
- 3) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 他 : 東京衛研年報, **50**, 65-69, 1999.
- 4) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 他 : 東京衛研年報, **56**, 105-110, 2005.
- 5) 日湯浅正治, 宇山悠男 : 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.

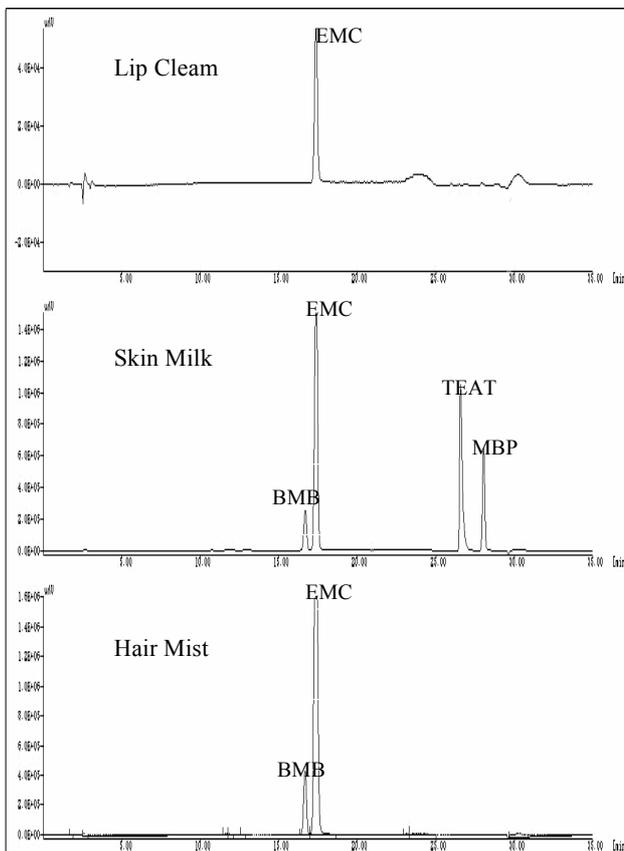


Fig 5. HPLC Chromatograms of Commercial Products