

短報

高速液体クロマトグラフィーによる 化粧品中の紫外線吸収剤 2,2'-メチレンビス (6-(2Hベンゾトリアゾール-2-イル)- 4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル) フェノール) の分析

仲野富美¹, 河合伸亮², 佐藤信夫², 小島 尚¹

Analytical method of 2,2'-Methylenebis (6-(2H-Benzotriazol-2-yl)-4- (1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenol) in cosmetics with HPLC

Fumi NAKANO, Shinsuke KAWAI,
Nobuo SATO and Takashi KOJIMA

はじめに

現在、太陽光線に含まれる紫外線の生体への有害性が問題視され、紫外線吸収剤を配合したスキンケア製品が多く販売されている。化粧品に配合される紫外線吸収剤は、薬事法上の化粧品基準¹⁾に収載されている成分についてのみ認められており、また、その配合上限値が厳密に定められている。2,2'-メチレンビス(6-(2Hベンゾトリアゾール-2-イル)-4-(1,1,3,3-テトラメチルブチル)フェノール)(MBBT)は平成16年10月1日に化粧品基準に収載された紫外線吸収剤で、粘膜に使用されることがない化粧品について配合が認められ、100g中の最大配合量は10.0gと設定されている。

化粧品中に含まれる紫外線吸収剤の分析法は、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いた多成分スクリーニング法が報告されている²⁻⁴⁾。横山らの方法²⁾では、MBBTは約52分に溶出し、分析対象とした13種類の紫外線吸収剤の中で分析に最も時間を要する成分である。また、MBBTは多種類の溶媒に難溶の性質である^{2,3)}。そこで、横山らの報告^{2,3)}を参考に、希釈溶媒、HPLCカ

ラム及び各種測定条件について、MBBTに適した方法を検討したので報告する。

試験方法

1. 標準品、試薬及び器材

MBBT(CAS No. 103597-45-1)標準品は東京化成(株)製試薬を用いた。構造式を図1に示す。アセトニトリル及びテトラヒドロフラン(THF)は和光純薬(株)製HPLC用試薬を、メタノール及びエタノールは和光純薬(株)製特級試薬を用いた。p-メトキシケイヒ酸エチルヘキシル、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタンは和光純薬(株)製試薬を、サリチル酸エチルヘキシル及びオキシベンゾン-3は東京化成(株)製試薬を用いた。シリンジフィルターはDISMIC-13HP(孔径0.45 μ m, アドバンテック製)及びGHPアクロディスク(孔径0.45 μ m, ポール製)を用いた。

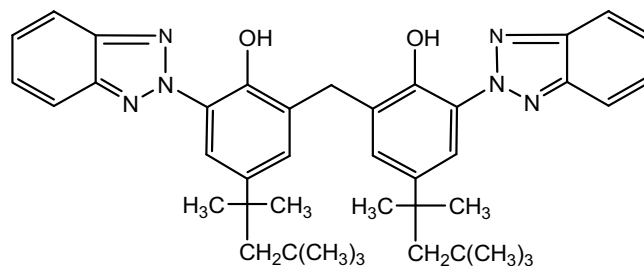


図1 MBBTの構造式

2. 化粧品中の定性及び定量分析法

(1) 標準溶液の調製

MBBT標準品約0.1gを精密に量りとり、THFに溶かして正確に100mlとした。この溶液5mlにアセトニトリルを加え、正確に25mlとしたものを標準原液とした。標準原液をアセトニトリル/THF混液(4:1)で希釈し、標準溶液(1, 5, 10, 50及び100 μ g/ml)を調製した。

(2) 試料溶液の調製

試料とした化粧品はMBBT1%配合クリーム、MBBT0.1%配合クリーム及び無配合クリームを用いた。

MBBT1%配合クリームは約0.1gを、0.1%配合クリームは約1gを精密に量りとり、THF10mlに溶解した。さらにアセトニトリル15mlを加え、超音波浴を用いて10分間抽出した後、アセトニトリルを加えて正確に50mlとした。この溶液をメンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。

(3) MBBTの定性

標準溶液をHPLCにより分析して得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルと、試

1. 神奈川県衛生研究所理化学部
〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
2. 株式会社コーセー 基礎研究室

料溶液から得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルを比較して定性を行った。

(4) MBBTの定量

試料溶液をHPLCにより分析し、得られたクロマトグラムからピーク面積値を測定し、別に作成した検量線により、試料溶液中のMBBTの濃度を求め、試料100g中に含有するMBBT量(g)を計算した。

(5) HPLC条件

装置：HP1100シリーズ (アジレント社製)、カラム：Zorbax Eclipse XDB-C8, 4.6mm×150mm (粒径5μm, アジレント社製)、カラム温度：40℃、移動相：アセトニトリル、移動相流量：1.0ml/分、検出器：ダイオードアレイ検出器、測定波長：200～400nm (検出波長305nm)、注入量：10μl

結果及び考察

1. 希釈溶媒の検討

MBBTは溶媒により溶解性が大きく異なることが報告されていることから^{2,3)}、標準溶液の希釈に用いる最適な溶媒について検討した。

MBBT溶液(4mg/ml, THF溶液)を、アセトニトリル、メタノール、エタノール、アセトニトリル/THF(1:1)混液、(4:1)混液及び(9:1)混液で希釈したのち、100μg/mlの標準溶液を調製し、密栓容器で4℃に保存した。調製当日、保存1日後、2日後、3日後及び7日後の標準溶液をHPLCで分析し、クロマトグラムのピーク面積値を測定した。調製当日の標準溶液のピーク面積値を100%として、4℃保存1日後、2日後、3日後及び7日後の標準溶液のピーク面積値の割合を計算した。結果を図2に示す。アセトニトリルは、保存1日後で約90%の面積値に減少し、それ以降も減少した。エタノールでは保存2日後まで、アセトニトリル/THF(1:1)混液及び(4:1)混液は7日後まで、アセトニトリル/THF(9:1)混液は1日後まで、調製当日の標準溶液のピーク面積値のほぼ100%であった。メタノールは調製直後からMBBTが析出したため、希釈溶媒に適さなかった。MBBTはTHFに可溶であるが、アセトニトリル、エタノールには難溶の性質であるため、調製後時間が経つと、一旦溶解したMBBTが徐々に析出すると考えられた。実際の検査では分析する試料数が多くなると、分析時間が長時間になることもあり得るため、標準溶液の安定性は正確な定量結果を出すために非常に重要な条件であると思われる。以上の結果から、標準溶液はTHFを約2割以上含むアセトニトリルで希釈することが必要であり、アセトニトリル/THF(4:1)混液を用いて希釈することとした。

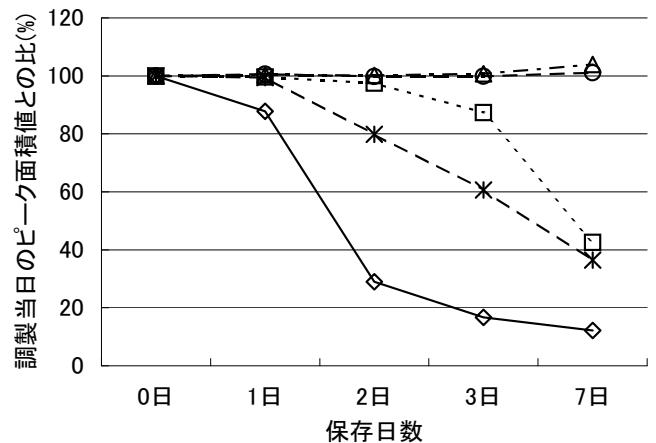


図2 希釈溶媒の種類によるMBBT標準溶液の安定性
◇：アセトニトリル、□：エタノール、△：アセトニトリル/THF(1:1)
○：アセトニトリル/THF(4:1)、×：アセトニトリル/THF(9:1)
標準溶液は4℃で保存した。

2. HPLC条件の検討

(1) カラム及び移動相

MBBTはODSカラムを用いて、アセトニトリル・水系の移動相で分析すると、溶出が遅く、分析時間が長くなったため、オクチルシリル化カラムを用いて分析を行った。オクチルシリル化カラムはZorbax Eclipse XDB-C8 4.6×150mm (粒径5μm, アジレント社製) 及び XTerra RP8 4.6×150mm (粒径3.5μm, ウォーターズ社製) を用い、移動相はアセトニトリル、アセトニトリル/水混液の混合比率9:1及び8:2を用い、流量0.5～1.0ml/分で最適条件の検討を行った。

Zorbax Eclipse XDB-C8カラムでは、移動相をアセトニトリルとし、流量1.0ml/分で分析を行ったところ、MBBTは保持時間7.0分にピークを認めた。紫外線吸収スペクトルは208nm, 305nm及び344nmに極大吸収を認め、検出波長305nmのとき、シンメトリー係数1.02, 理論段数10000段以上で、ピーク形状も良好であった(図3, 4)。XTerra RP8カラムを用いた場合、移動相をアセトニトリル、流量0.5ml/分としたとき、保持時間6.7分にピークを認めた。検出波長305nmのとき、シンメトリー係数0.94, 理論段数11000段以上で良好なピーク形状であった。オクチルシリル化カラムでは、分析時間も短く、良好な分析結果が得られた。以上のことから、今回の分析では、より一般的なシリカベースのカラムであるZorbax Eclipse XDB-C8を用いた条件により分析を行うこととした。

(2) 再現性の確認

標準溶液(10μg/ml)を6回繰り返して測定した。その結果、クロマトグラムのピーク保持時間の相対標準偏差が0.10%、ピーク面積値の相対標準偏差が0.50%であっ

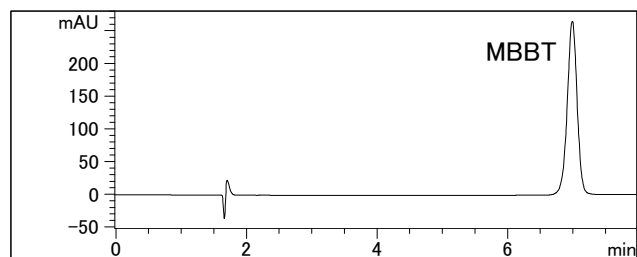


図3 標準溶液 (100 μg/mL) のHPLCクロマトグラム

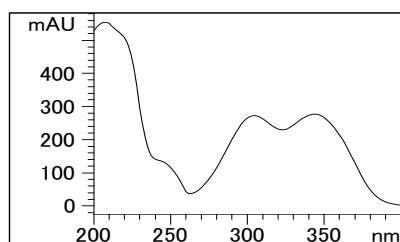


図4 標準溶液 (100 μg/mL) の紫外線吸収スペクトル

た。日本薬局方においては、HPLC法における試験の再現性は、通常、標準溶液を6回繰り返し注入し、ピーク面積値の相対標準偏差が1.0%以下であることが望まれる⁵⁾とされており、今回の分析法は再現性が高い結果が得られた。

(3) 検量線

検量線の直線性を確認するため、0.1~200 μg/mlの濃度範囲の標準溶液を用いて分析を行ったところ、0.2~200 μg/mlで直線性が認められた。標準溶液1, 5, 10, 50及び100 μg/mlを用いて、検量線を3回作成したところ、回帰直線の傾きは 0.0354 ± 0.0001 、y切片は 0.190 ± 0.008 、相関係数は1.00であった(図5)。なお、今回の分析法の定量限界は、S/N比10で求めた結果、1.5ngであった。

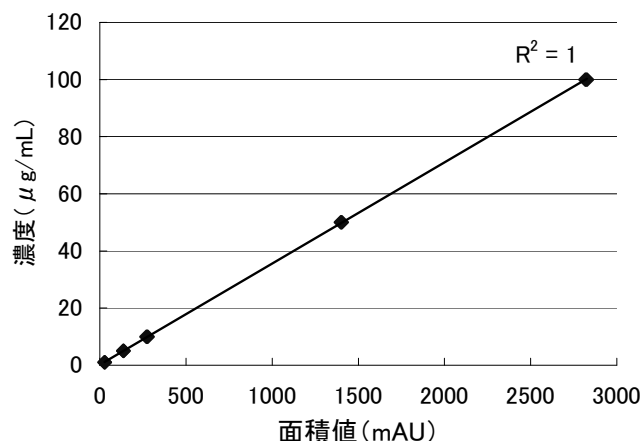


図5 標準溶液1~100 μg/mLにおける検量線

(4) その他の紫外線吸収剤の影響

現在、市販製品で多く使用されている4種類の紫外線吸収剤⁴⁾ p-メトキシケイヒ酸エチルヘキシル、4-tert-ブチル-4'-メトキシジベンゾイルメタン、サリチル酸エチルヘキシル及びオキシベンゾン-3について、今回の分析法により分析を行ったところ、これらの物質はほとんど保持されず、MBBTのクロマトグラムの保持時間付近にはピークを認めなかった。

3. 化粧品中のMBBTの測定結果

(1) 試料溶液の調製方法の検討

試料0.1 gに標準溶液の希釈溶媒として最適であったアセトニトリル/THF (4:1) 混液を加え、超音波抽出を行ったところ、試料がうまく溶解、分散せず、抽出に適さないことが確認できた。そのため、横山らの方法^{2, 3)}に準じて、試料を一定量のTHFで溶解させた後、アセトニトリルを加えて、超音波抽出する方法で調製することとした。抽出に使用するアセトニトリルとTHFの容量の比率は4:1となるようにした。

(2) 添加回収試験

無配合クリームにMBBTが1%及び0.1%となるようにMBBT溶液(THF溶液)を添加し、添加回収試験を行った。その結果、1%量のMBBTを添加したときの回収率は98.0~99.3%(n=6, 相対標準偏差0.49%)、0.1%量添加したときの回収率は96.4~100.6%(n=6, 相対標準偏差1.72%)であった。回収率はほぼ100%に近い結果となり、良好な結果となった。

(3) MBBTの定性結果

標準溶液及び試料溶液をHPLCにより分析した結果、得られたクロマトグラムのピーク保持時間及び紫外線吸収スペクトルは一致した(図6, 図7)。クリーム中のMBBTを定性測定することが可能であった。

(4) MBBTの定量結果

定量結果を表1に示す。1%配合クリーム及び0.1%配合クリームは、いずれもほぼ配合量どおりの定量結果が得られ、今回行った抽出方法でクリーム中のMBBTを定量することが可能であった。3回の定量結果は相対標準

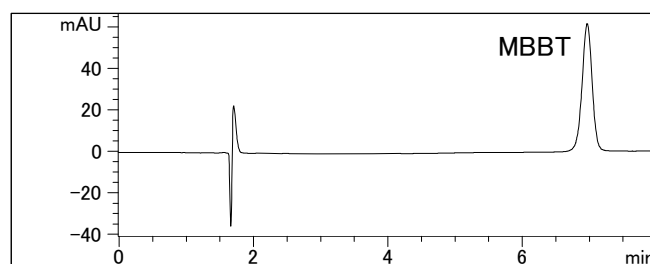


図6 1%MBBT配合クリームのHPLCクロマトグラム

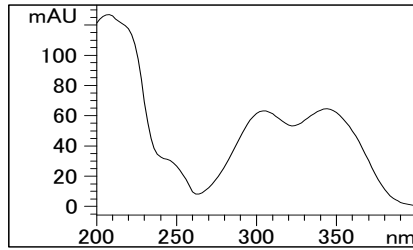


図7 1%MBBT配合クリームの紫外線吸収スペクトル

偏差が5.2%及び3.7%であり、ややばらつきが認められた。試料として用いたMBBT配合クリームは、MBBTが溶解性の悪い物質であるため、クリーム中に溶解させるのではなく、顔料のように分散させたものであった。そのため試料中のMBBTの均一性がやや悪かったことが原因であったと考えられた。

表1 1%及び0.1%配合クリームの定量結果 (n=3)

	1%配合 クリーム	0.1%配合 クリーム
試料100g中の 含有量 (g)		
1	1.018	0.1009
2	1.107	0.0963
3	1.008	0.1036
平均	1.04	0.100
標準偏差	0.06	0.004
相対標準偏差 (%)	5.2	3.7

まとめ

HPLCによる化粧品中のMBBTの分析法を検討した。カラムはオクチルシリル化カラムを、移動相はアセトニトリルを用いて分析を行うことで良好な結果が得られた。MBBT標準品はアセトニトリルなどに難溶であるため、標準溶液を調製する際、THFを一定量(20%程度)含むアセトニトリルに溶解する必要があった。なお、検量線は1~100 μ g/mlの濃度範囲で良好な直線性を示し、定量限界は1.5ngであった。

謝辞

本研究を実施するにあたり、御助言及び化粧品の御提供を頂きました日本薬学会衛生試験法化粧品専門委員会徳永裕司委員長をはじめ、委員の先生方に深謝いたします。

(平成20年7月28日受理)

参考文献

- 1) 化粧品基準, 厚生省告示第331号, 平成12年9月29日
- 2) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島潔, 大貫奈穂美, 宮本道子ほか: 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, 東京都健康安全研究センター研究年報, 57, 145-150 (2006)
- 3) 横山敏郎, 森謙一郎, 中村義昭, 寺島潔, 大貫奈穂美, 荻野周三: 医薬部外品及び化粧品中の紫外線吸収剤同時分析法, 東京都健康安全研究センター研究年報, 56, 105-110 (2005)
- 4) 五十嵐良明, 山田真生, 内野正, 徳永裕司: 液体クロマトグラフィーによる化粧品中の9種の紫外線吸収剤の一斉分析, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 65-71 (2007)
- 5) 第15改正日本薬局方解説書, pp.B101-130, 廣川書店, 東京 (2006)