

化粧品に配合が制限されている成分の分析法に関する研究：
2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル) ベンゾトリアゾール

徳永裕司[#], 森 謙一郎^{*1}, 野坂富雄^{*2}, 土井佳代^{*3}, 坂口 洋^{*4}, 藤井まき子^{*5}, 高野勝弘^{*6},
林 正人^{*7}, 磯 敏明^{*8}, 西尾裕幸^{*9}, 佐藤信夫^{*10}

Studies for analyzing the restricted ingredients such as 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole

Hiroshi Tokunaga, Kenichiro Mori^{*1}, Tomio Nosaka^{*2}, Kayo Doi^{*3}, Hiroshi Sakaguchi^{*4}, Makiko Fujii^{*5},
Katuhiro Takano^{*6}, Masato Hayashi^{*7}, Toshiaki Iso^{*8}, Hiroyuki Nishio^{*9}, Nobuo Sato^{*10}

2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole (HMB) is nominated as the restricted ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for HMB was investigated by HPLC. After dissolving HMB in cream or oil with tetrahydrofuran and making the constant volume with methanol, the test solution was prepared. Twenty micro-liter of the test solution was determined by HPLC by using CAPCELL PAK C₁₈ column, the mixture of methanol and water (17:3) as mobile phase, the detection wavelength at 306 nm. The concentrations of 10 to 80 µg/ml HMB gave the linear relationship between the concentrations and the peak areas. In creams and oil 0.1% and 1% HMB were sufficiently determined by the established method.

Key Words: 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl)-benzotriazole, HPLC, restricted ingredients, cream, oil

1. 緒 言

平成12年9月29日、厚生省医薬安全局長から医薬発第990号「化粧品規制緩和に係る薬事法施行規則の一部改正等について」が通知された。化粧品の規制緩和については、「化粧品規制の在り方に関する検討会」が組織され、その最終とりまとめを踏まえ、医薬発第990号の通知が出されたものである。この通知には、「薬事法施行規則の一部を改正する省令」、「厚生大臣の指定する化粧品の成分を定める件」、「化粧品基準を定める件」及び「名称を記載しなければならないものとして厚生大臣の指定する医薬部外品及び化粧品の成分を定める件」の改正が含まれており、平成13年4月1日から実施されている。

この改正により、新たに「化粧品品質基準」が定めら

れ、これまでの化粧品に用いられる新規原料に関して、承認・許可の手続きが廃止された。この基準の第3条には、「防腐剤、紫外線吸収剤及びタール色素以外の成分の配合制限」が別表第2に規定され、2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル) ベンゾトリアゾール (HMB) を始めとして18品目が含まれている。

今回、石けん、シャンプー等の直ちに洗い流す化粧品以外の化粧品に100g中に最大配合量7gまでの使用が認められているHMBの液体クロマトグラフ法による試験法を検討し、化粧品中のHMBの試験法を確立したので報告する。

2. 実 験

2.1 装置

液体クロマトグラフ (HPLC) 装置は、島津製LC-10A型ポンプ、島津製CTO-10A型カラムオープン、島津製SPD-6AV型紫外可視検出器、島津製L-10AXL型オートサンプラーおよび島津製C-R6A型クロマトパックを連結して用いた。

2.2 試薬および試液

HMBは東京化成製のものを用いた。その他の試薬は試薬特級品を用いた。

HMBは油溶性の高い物質であるため、0.1%及び1%

[#] To whom correspondence should be addressed: Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan:

Tel:03-3700-1141 ext.255; Fax: 03-3707-6950;

E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

^{*1} 東京都衛生研究所, ^{*2} 埼玉県衛生研究所, ^{*3} 神奈川県衛生研究所, ^{*4} 北里大理学部, ^{*5} 昭和薬科大学, ^{*6} 日本化粧品工業連合会, ^{*7} 資生堂リサーチセンター, ^{*8} ポーラ化成工業株式会社中央研究所, ^{*9} カネボウ株式会社化粧品研究所, ^{*10} コーセー株式会社研究本部

のHMBを含有する化粧オイル及びクリームを資生堂リサーチセンターで調製し、試験に供した。

HMB標準溶液：HMB約100 mgを精密に量り、テトラヒドロフランを加えて溶かし正確に100 mlとした。

2.3 HMBの定量法

試料0.2～2 gを精密にはかり、ビーカーに入れる。テトラヒドロフラン2 mlを加え、ガラス棒でかき混ぜながら基材を十分に溶解させる。50 mlのメスフラスコに移し、メタノールにて洗い込む。ビーカーにテトラヒドロフラン2 mlを加え、ガラス棒でかき混ぜる。溶解液をメスフラスコに合わせ、メタノールにて50 mlとし、試料溶液とする。試験溶液20 μ lを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラム上のピーク面積をはかり、別に作成した検量線から試験溶液中のHMBの濃度Aを求め、次式により試料100 g中の含有量を算出する。

検量線の作成：標準溶液をメタノールで希釈し、1 ml当たり、10, 40および60 μ gを含む標準系列をつくり、各20 μ lを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラム上のピーク面積と濃度から検量線を作成する。

$$\text{試料100g中のHMBの量} = \frac{A \times 50}{\text{試料採取量(g)}} \times \frac{1}{1000} \times 100$$

操作条件

検出器：紫外吸光光度計（測定波長：306 nm）

カラム：内径約4 mm、長さ25 cmのステンレス管に5 μ mの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シリカゲルを充填する。

カラム温度：35℃付近の一定温度

移動相：メタノール/水混液（17：3）

流量：HMBの保持時間が約9分になるように調整する。

3. 結果および考察

HMB標準溶液の一定量を正確に量り、メタノールを加えて希釈し、1.0 ml当たりHMB 60 μ gを含有する溶液を調製し、その液20 μ lを用いて以下の検討を行った。

3.1 アセトニトリルの影響

メタノール/水混液の比率を（100：0）～（70：30）まで変化させ、HMBの保持時間（ t_R ）の変化を検討した。用いたカラムとして、資生堂製CAPCELL PAK C₁₈（4.6 mm i.d.×250 mm）、ジェルサイエンス製のUnisil Q C₁₈（4.6 mm i.d.×150 mm）及び東ソー製TSKgel ODS（4.6 mm i.d.×150 mm）の3種類のカラムを用いた。その結果をFig.1に示した。

Fig.1から分かるように、メタノールの濃度が70～100%に上がるに従い、 t_R が25分～3.5分に減少することが分かった。この結果より、資生堂製CAPCELL PAK C₁₈カラムにて、 t_R 9分を示したメタノール/水混液（17：3）を移動相に用いることにした。その他の2本のカラムもHMBの測定に利用できることが明らかになった。

3.2 カラム温度の影響

カラム温度を25～40℃に変更し、カラム温度のHMBの t_R への影響を検討した。カラム温度の上昇に伴い、HMBの t_R は10～8.4分にわずかに低下した。このことより、カラム温度を35℃に設定することにした。

3.3 検量線および再現性

HMB標準溶液の一定量を正確に量り、メタノールで希釈し、1 ml当たりHMB 10～80 μ gを含有する溶液を調製した。この液20 μ lを用いて、検量線の作成を行った。その結果をFig.2に示した。

Fig.2から分かるように、HMBの濃度とピーク面積の間には良好な直線関係が成立した。

HMBの10 μ g/ml及び80 μ g/mlの溶液20 μ lを用い、5回の繰り返し注入によるピーク面積の平均値（相対標準偏差）は、それぞれ、649040（0.43%）及び5174371（0.42%）であった。

3.4 化粧品への応用

HMB1%を含有するクリーム約0.2 gを精密に量り、2.3. HMBの定量法に従って調製した試料溶液20 μ lから

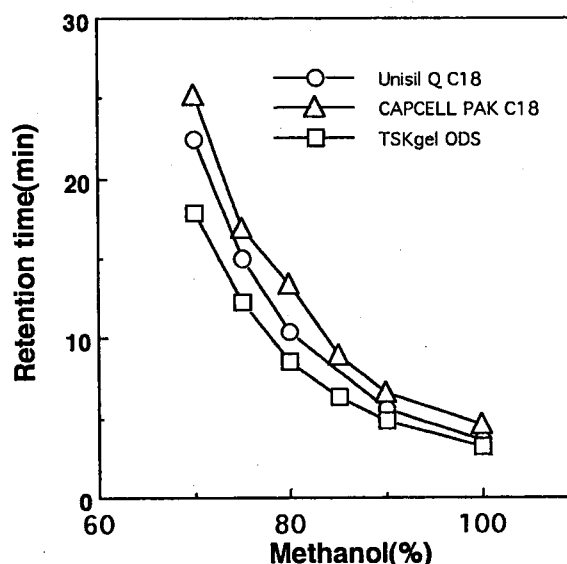


Fig. 1 Effect of methanol on retention time of 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole

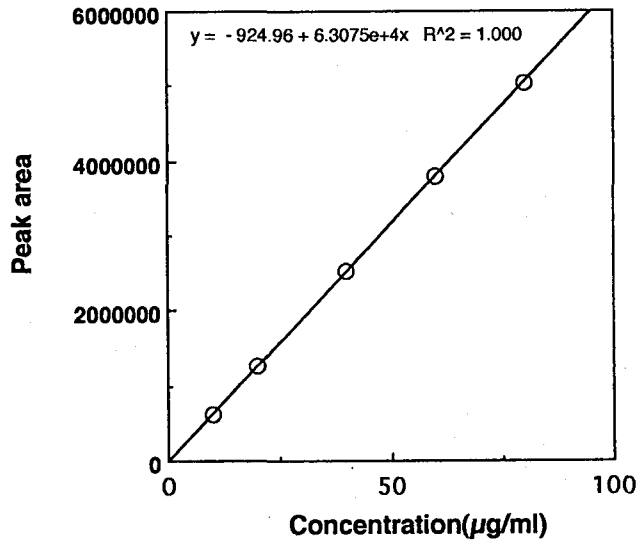


Fig. 2 Working Curve for 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole

HPLC conditions: column, CAPCELL PAK C₁₈; mobile phase, the mixture of methanol and water (17:3), flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C, detection wavelength, 306 nm

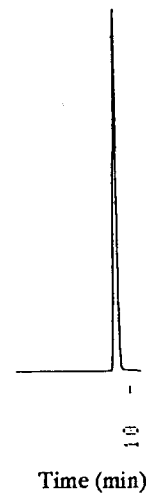


Fig. 3 Chromatogram for 2-(2'-hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole in cream

HPLC conditions: column, CAPCELL PAK C₁₈; mobile phase, the mixture of methanol and water (17:3), flow rate, 1 ml/min; column temperature, 35 °C, detection wavelength, 306 nm

得られたHPLCクロマトグラムをFig.3に示した。

Fig.3から分かるようにクリーム中の賦形剤の妨害を受けることなく、HMBが測定できることが明らかになった。操作法では、クリームあるいは化粧オイルに溶解するため、テトラヒドロフランを2 ml用いているが、テトラヒドロフランの使用量を2~20 mlの範囲まで変更しても、HPLC法での定量に影響を与えないことが分かった。

クリームおよび化粧オイル中のHMBの測定を行い、その結果をTable 1に示した。

Table 1から分かるように、クリームあるいは化粧オイル中のHMBは十分に測定できることが明らかになった。

4. まとめ

化粧品への使用が制限されている2-(2-ヒドロキシ-5-メチルフェニル)ベンゾトリアゾールの液体クロマトグラフ法による測定法を確立し、試作したクリームあるいは化粧オイルに適応し、今回確立した方法が十分に応用できることが分かった。

Table 1 2-(2'-Hydroxy-5'-methylphenyl) benzotriazole in creams and oils

	weigh(g)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)	avrage (%)	RSD(%)
0.1% cream 1	1.9969	2438169	2447977	2443073	96.0	95.8	0.69
0.1% cream 2	1.9957	2416727	2426634	2421681	95.0		
0.1% cream 3	2.0019	2437992	2455229	2446611	96.3		
1% cream 1	0.2008	2602352	2592586	2597469	104.1	102.1	3.03
1% cream 2	0.2005	2590868	2590486	2590677	103.6		
1% cream 3	0.1994	2476949	2473437	2475193	98.5		
0.1% oil 1	1.9992	2422079	2422385	2422232	97.7	97.6	0.30
0.1% oil 2	1.9961	2430543	2397486	2414015	97.2		
0.1% oil 3	2.0006	2436537	2406936	2421737	97.8		
1% oil 1	0.2013	2490172	2482164	2486168	101.0	101.5	0.62
1% oil 2	0.2022	2507124	2505461	2506293	102.2		
1% oil 3	0.2014	2497387	2497847	2497617	101.5		