

化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究：塩酸テトラカイン

徳永裕司[#], 竹内織恵, 内野 正, 安藤正典

Studies for Analyzing the Prohibited Ingredients Such As Tetracaine Hydrochloride in Cosmetics

Hiroshi Tokunaga[#], Oriie Takeuchi, Tadashi Uchino and Masanori Ando

Tetracaine hydrochloride (TH) is nominated as the prohibited ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for TH was investigated by HPLC. After adding 5 ml of TH solution at 10 $\mu\text{g/ml}$ and 2 ml of salicylic acid solution at 75 $\mu\text{g/ml}$ as the internal standard to 0.5 g of the lotion, the mixture was made up to 10 ml with a mixture of water and methanol (1:1) as the testing solution. Milky lotion was proceeded as follows: After adding 5 ml of TH solution at 10 $\mu\text{g/ml}$ and 2 ml of internal standard solution to 0.5 g of the milky lotion, the mixture was made up to 10 ml with a mixture of water and methanol (1:1). Two milliliter of this mixture was placed into a centrifuging tube with a cap and 2 ml of hexane was added. After shaking vigorously and centrifuging, the lower layer was used as the testing solution. In the case of the cream, the other procedures were used: 0.5 g of cream was placed into a 10-ml volumetric flask and 1 ml of tetrahydrofuran was added. After dissolving, the mixture of methanol and water (1:1) was added to make up 10.0 ml. Two milliliter of this mixture was placed into a centrifuging tube with a cap and 2.0 ml of hexane was added. After shaking vigorously and centrifuging, the lower layer was used as the testing solution. The testing solution of 20 μl was analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C₁₈ column, 4.6 x 250 mm), the mixture of acetonitrile and 50 mmol/l phosphate buffer(pH 2.0)(7:3) and the detection wavelength of 303 nm. The working curves from 0.5 to 6.0 $\mu\text{g/ml}$ showed a linear line between the concentrations of TH and the peak area ratio. There was no interference of peak of TH from the lotion, milky lotion and cream.

Key Words: tetracaine hydrochloride, local anesthetics, Japanese Pharmaceutical Affairs Act, cosmetics

1. 緒言

平成13年4月1日より,化粧品の承認・許可に当たつての規制緩和が行われ,化粧品に使用される成分のポジティブリスト,ネガティブリストの採用および製品に用いられた全成分の表示が義務付けられた.化粧品基準第4条の別表1¹⁾には,化粧品に使用することが禁止されている成分,塩酸テトラカイン(プロカイン等の局所麻酔剤)がある.塩酸テトラカイン(TH)は第14改正日本薬局方²⁾に記載されている.製剤は,歯科用液(6%)と注射用1アンプル20mgが使用されている.歯科用の用途としては,局所への塗布である.また,注射用の用途としては,ブドウ糖液あるいは生理食塩液に溶解し,0.1,0.5あるいは1.0%の溶液として,脊椎麻酔,硬膜外麻酔,伝達麻酔などの局所麻酔に用いられている. THの分析法としては,口腔錠のcetylpyridinium chlorideおよびTHの液体クロマトグラフ法³⁾, THおよびその分解物, p-n-butylaminobenzoic acidの液体クロマトグラ

フによる同時分析法⁴⁾,動物薬,Tanax(有効成分: embutramide, mebenzonium iodide, TH)中のembutramideの液体クロマトグラフ法およびGC-MS法での比較研究⁵⁾などが報告されている.

今回,著者らは,化粧品に使用することが禁止されている成分, THの分析法としてCAPCELL PAK C₁₈カラムを用いた液体クロマトグラフ法を検討し,市販化粧水,乳液およびクリーム中のTHの測定に応用したので報告する.

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. THの吸収スペクトルの測定には,島津製UV-260型紫外可視分光光度計を用いた.

2.2 試薬および試液

THはシグマ社製のもの,サリチル酸(SA)は和光純薬製

[#] To whom correspondence should be addressed: Hiroshi Tokunaga; 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501 Japan; Tel. 03-3700-1141; Fax; 03-3707-6950; E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

の試薬特級品を用いた。その他の試薬は試薬特級品を用いた。液体クロマトグラフ用カラムは資生堂製のCAPCELL PAK C₁₈(粒径 5 μm, 内径 4.6 mm, 長さ 25 cm)を購入した。化粧品は市販の化粧水 2 種類, 乳液 1 種類およびクリーム 2 種類を用いた。

TH原液: TH約 25 mgを精密に量り, 水/メタノール混液(1:1)を加えて正確に 50 mLとした。(0.50 mg/mL)

SA原液: SA約 25 mgを精密に量り, 水/メタノール混液(1:1)を加えて正確に 50 mLとした。(0.50 mg/mL)

TH溶液: TH原液の一定量を正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)で希釈し, 1 mL当たり TH10.0 μgを含む溶液を調製した。

内標準溶液: SA原液の一定量を正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)で希釈し, 1 mL当たり SA75.0 μgを含む溶液を調製した。(SA溶液)

リン酸試液: リン酸 4.90 gを水 1000 mLに溶かした。(50 mmol/L)

リン酸二水素カリウム試液: リン酸二水素カリウム 6.80 gを水 1000 mLに溶かした。(50 mmol/L)

50 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH 2.0): リン酸試液 500 mLにリン酸二水素カリウム試液を加え, pHを 2.0に調整した。

2.3 定量法

化粧水の場合: 化粧水約 0.5 gを精密に量り, 10 mLのメスフラスコに入れ, TH溶液 5.0 mL, 内標準溶液 2.0 mLを加え, 水/メタノール混液(1:1)にて 10 mLとし, 試料溶液とした。別に, TH約 0.025 gを精密に量り, 水/メタノール混液(1:1)を加えて溶かし, 正確に 50 mLとした。この液 5 mLを正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)にて正確に 50 mLとした。この液 10 mLを, 正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)にて正確に 50 mLとした。この液 5.0 mL, 内標準溶液 2.0 mLを加え, 水/メタノール混液(1:1)にて 10 mLとし, 標準溶液とした。試料溶液および標準溶液 20 μLにつき, 次の条件で液体クロマトグラフ法を行い, THのピーク面積比 Q_T および Q_S を求めた。

THの量(mg) = THの秤取量(mg) × Q_T / Q_S × 1 / 5000

操作条件

検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 303 nm)

カラム: 内径約 4.6 mm, 長さ 25 cmのステンレス管に 5 μmの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シランを充填する。

カラム温度: 35 付近の一定温度

移動相: 50 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH2.0) / アセトニトリル混液(7:3)

流量: THの保持時間が約 10 分になるように調整する。乳液の場合: 乳液約 0.5 gを精密に量り, TH溶液 5.0 mL, 内標準溶液 2.0 mLを加え, 水/メタノール混液(1:1)にて 10 mLとする。この液 2.0 mLを共栓遠沈管に入れ, ヘキサン 2.0 mLを加えて激しく振り混ぜる。静置した後 3000 rpmで 5

分間遠心分離を行う。上層を除き, 下層を試料溶液とする。以下, 化粧水の操作法を準用する。

クリームの場合: クリーム約 0.5 gを精密に量り, 10 mLの共栓試験管に入れ, テトラヒドロフラン 1.0 mLを加えて基材を完全に溶かす。TH溶液 5.0 mLを加え, 水/メタノール混液(1:1)にて 10 mLとする。この液 2.0 mLを共栓遠沈管に入れ, ヘキサン 2.0 mLを加えて激しく振り混ぜる。静置した後 3000 rpmで 5 分間遠心分離を行う。上層を除き, 下層を試料溶液とする。別に, TH約 0.025 gを精密に量り, 水/メタノール混液(1:1)を加えて溶かし, 正確に 50 mLとした。この液 5 mLを正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)にて正確に 50 mLとした。この液 10 mLを, 正確に量り, 水/メタノール混液(1:1)にて正確に 50 mLとした。この液 5.0 mLに水/メタノール混液(1:1)を加えて正確に 10 mLとし, 標準溶液とする。試料溶液および標準溶液 20 μLにつき, 次の条件で液体クロマトグラフ法を行い, THのピーク面積 A_T および A_S を求める。

THの量(mg) = THの秤取量(mg) × A_T / A_S × 1 / 5000

3. 結果および考察

3.1 紫外外部吸収スペクトル

20 μg/mLのTHあるいはSAの水/メタノール混液(1:1)溶液を調製し, 紫外外部吸収スペクトルを測定し, Fig.1に示した。なお, SAは, THの液体クロマトグラフ法で測定する際の内標準物質として用いるため, 一緒に検討した。

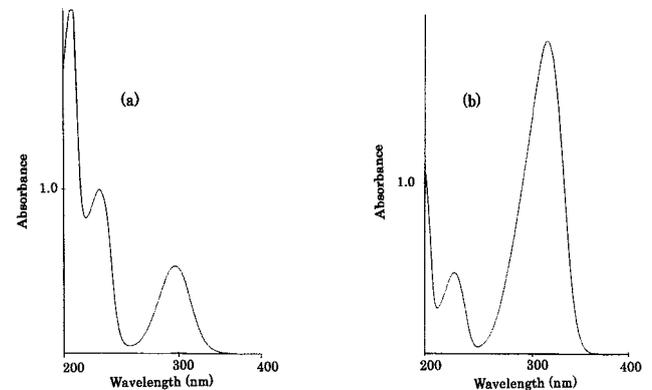


Fig.1 UV spectra for tetracaine hydrochloride (a) and salicylic acid (b) at 20 μg/mL

Fig.1から分かるようにTHは 228 および 314 nmに吸収極大波長を, SAは 232 および 298 nmに吸収極大波長を持つことが分かった。両者の吸収極大波長を考慮し, 検出波長を 303 nmとすることにした。

3.2 アセトニトリルの影響

50 mmol/L リン酸塩緩衝液(pH2.0) / アセトニトリル混液中のアセトニトリル濃度を 25 ~ 40%と変化させ, THおよ

びSAの保持時間(t_R)の変化を測定した。その結果をFig.2に示した。

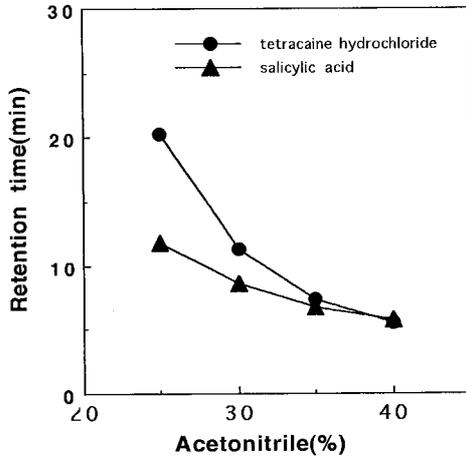


Fig.2 Effect of acetonitrile on retention time of tetracaine hydrochloride and salicylic acid

THの t_R の変化は20.3~5.5分, SAの t_R の変化は11.8~5.8分と減少した。測定時間を考慮し, THの t_R 11.3分を示した30%のアセトニトリルに相当する50 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH2.0)/アセトニトリル混液(7:3)を用いることにした。

3.3 pHの影響

3.1の検討で, 50 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH2.0)/アセトニトリル混液(7:3)を用いることにしたが, 50 mmol/Lリン酸塩緩衝液のpHの影響を検討するため, 移動相の50 mmol/Lリン酸塩緩衝液/アセトニトリル混液の割合を(3:1)に変更し, リン酸塩緩衝液のpHを2.0~3.5に変化させたときの, t_R の変化を検討した。その結果をFig.3に示した。

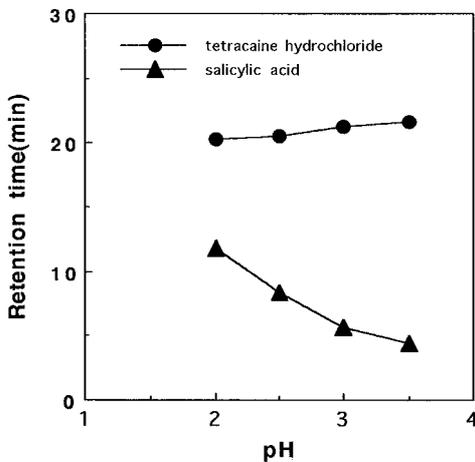


Fig.3 Effect of pH on retention time of tetracaine hydrochloride and salicylic acid

50 mmol/Lリン酸塩緩衝液のpHを2.0~3.5に変更した時, THの t_R は20.3~21.7分とほとんど変化はなかった。しかし, SAの t_R は11.8~4.4分と大きく減少した。このことより, 50 mmol/Lリン酸塩緩衝液のpH 2.0を用いることにした。

3.4 カラム温度およびイオン強度の影響

移動相として50 mmol/Lリン酸塩緩衝液(pH2.0)/アセトニトリル混液(7:3)を用い, カラム温度を25~45あるいはイオン強度を25~100 mmol/Lに変更した。THおよびSAの t_R の変化はほんの僅かであった。その結果, カラム温度として35を, イオン強度として50 mmol/Lを用いることにした。

3.5 THの検量線

内標準物質のSAの濃度を15 μ g/mLと一定濃度とし, THの濃度を0.5~6.0 μ g/mLとした溶液を調製し, その20 μ Lを用いて, 検量線の作成を行い, Fig.4に示した。

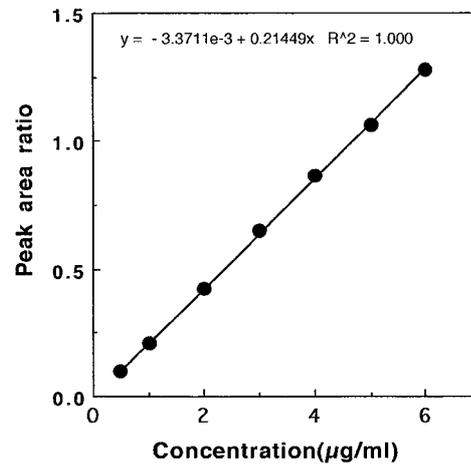


Fig.4 Working curve for tetracaine hydrochloride

Fig.4から分かるように, TH濃度とピーク面積比の間には良好な直線関係が成立した。

THの0.5 μ g/mLおよび5.0 μ g/mLを含む溶液20 μ Lを用い, 6回の繰り返し注入を行い, 再現性の検討を行った。TH0.5 μ g/mLおよび5.0 μ g/mLから得られたピーク面積比の平均値(相対標準偏差)は, それぞれ0.100(4.05%)および1.064(0.96%)であった。

3.6 化粧品への応用

化粧水の場合, 化粧水0.5gにTH溶液5.0 mLおよびSA溶液2.0 mLを加え, 水/メタノール混液(1:1)で10 mLとし, その液20 μ Lを用いて測定する方法である。化粧水中の賦形剤の影響がなければ, 3.5の検量線の項で示した測定値(ピーク面積比)が得られると考えられる。しかし, 乳液の場合, 油溶性の賦形剤によるHPLCカラムの劣化を防ぐため, 脂溶性の物質をヘキサンで取り除く必要があった。そこで, 水/メタノール混液(1:1)層からヘキサン層への

THあるいはSAの移行を検討した。10 µg/mLのTH溶液10.0 mLおよび75 µg/mLのSA溶液4.0 mLを20 mLのメスフラスコに加え、水/メタノール混液(1:1)にて20.0 mLとした。この液2.0 mLにヘキサン2.0 mLを加えて激しく振り混ぜ、水/メタノール混液(1:1)層への残存率を検討した。6回の測定の結果、回収率の平均値(相対標準偏差)は102.0%(1.94%)であった。この結果より、THおよびSAは完全に水/メタノール混液(1:1)に残留することが分かった。

次に、クリーム中の油溶性の賦形剤を除く方法について検討した。水/メタノール混液(1:1)を用いてクリームの基材を溶解することは困難である。そこで、クリーム0.5 gをテトラヒドロフラン1.0 mLに完全に溶解させた後、10 µg/mLのTH溶液5.0 mLおよび75 µg/mLのSA溶液2.0 mLを加え、水/メタノール混液(1:1)にて10.0 mLとした。この液2.0 mLにヘキサン2.0 mLを加えて激しく振り混ぜ、THおよびSAの水/メタノール混液(1:1)への残存率を検討した。それぞれ、6回の測定結果より得られたTHおよびSAの水/メタノール混液(1:1)への残存率の平均値(相対標準偏差)は、それぞれ102.6%(0.69%)および85.8%(0.83%)であった。この結果より、テトラヒドロフランで溶解後にTHおよびSAを添加する方法の場合、THは完全に水/メタノール混液(1:1)層に残留するもののSAの一部はテトラヒドロフランのヘキサン層への移行に伴い移動することが明らかになった。この結果より、クリームの場合には、内標準物質としてのSAを添加しない方法を用いることにした。

以上の結果より、化粧水、乳液およびクリームの場合、実験の部の2.3の定量法に示したように、別々の操作法を用いることにした。

Fig.5に化粧水および乳液にTHおよび内部標準物質のSAを添加したもののHPLCクロマトグラムを示した。Fig.5(a)の1およびFig.5(b)の1に該当するピークがSAに由来するピークであり、Fig.5(a)の2およびFig.5(b)の2に該当するピークがTHに由来するピークである。

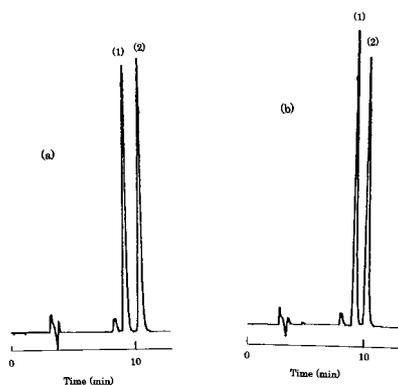


Fig.5 HPLC Chromatograms for Lotion A(a) and Milky Lotion C(b)

今回検討した化粧水AおよびB、乳液CおよびクリームDおよびEの場合において、SAあるいはTCの位置に化粧品中の賦形剤による妨害ピークを観察することができなかった。

化粧品にTHを添加した5検体について測定した結果をTable 1に示した。

Table 1 Recoveries of tetracaine hydrochloride from cosmetics

	Lotion A	Lotion B	Milky lotion C	Cream D	Cream E
No.1	100.5	99.2	98.5	101.7	101.6
No.2	99.5	97.0	104.1	101.5	105.8
No.3	100.2	99.4	104.2	102.0	101.2
No.4	98.6	97.4	103.8	102.4	102.6
No.5	98.1	98.1	103.9	101.2	100.9
No.6	99.2	99.6	104.7	101.6	104.1
average	99.4	98.5	103.2	101.7	102.7
R.S.D(%)	0.92	1.12	2.25	0.41	1.86

Table 1から分かるように、化粧水A、化粧水B、乳液CおよびクリームDおよびEに0.01%相当量のTHを添加した時のTHの回収率は、それぞれ99.4%、98.5%、103.2%、101.7%および102.7%であり、今回確立した液体クロマトグラフ法により十分に分離確認し、定量出来ることが明らかになった。定量範囲として、薬効を期待したTHの不法な添加を考え、注射液の0.1%の1/10が十分に定量できる0.01%(0.5 µg/mLの場合)を設定した。更に、定量下限として0.001%(0.05 µg/mLの場合)が定量できる方法を設定した。

文献

- 1) Notification No.331 of Ministry of Health and Welfare dated on September 29, 2000
- 2) Japanese Pharmacopeia Fourteenth Edition, Ministry of Health, Labour and Welfare, p.341(2001)
- 3) Wan J., Lu J., Hu Y.,: J.Pharm.Biomed.Anal., 32, 381-386(2003)
- 4) Menon G.N., Norris B.J.: J.Pharm.Sci., 70, 569-570(1981)
- 5) Giorgi M., Bertini S., Soldani G., Giusiani M.: J.Anal.Toxicol., 25, 323-327(2001)