

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：アセトヘキサミド

徳永裕司[#]，内野 正Studies for Analyzing the Prohibited Ingredients Such
As Acetohexamide in CosmeticsHiroshi Tokunaga[#] and Tadashi Uchino

Acetohexamide (AH) is nominated as the prohibited ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for AH was investigated by HPLC. The lotion or milky lotion of 0.5g was put into a 10-ml volumetric flask. After adding 1.0ml of AH solution at 50 $\mu\text{g/ml}$ into the volumetric flask, the mixture was made up to 10ml with methanol as the testing solution. Creams were procedured as follows; 0.5 g of cream was put into a 10-ml volumetric flask. After adding 1.0ml of tetrahydrofuran into the volumetric flask, the mixture was stirred for several minutes and the ingredients of the creams were dissolved. After adding 1.0ml of AH solution at 50 $\mu\text{g/ml}$ into the volumetric flask, the mixture was made up to 10ml with methanol. One milliliter of the mixture including AH at 5 $\mu\text{g/ml}$ was exactly put into a test tube with a cap and then 1 ml of water and 1 ml of hexane were added. After shaking vigorously, stand for several minutes. After centrifuging, the hexane layer was eliminated and the residual mixture was used as the test solution. The testing solution of 20 μl was analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C_{18} column, $4.6 \times 250\text{mm}$), the mixture of acetonitrile and 50 mmol/l phosphate buffer(pH 5.3)(3:1) and the detection wavelength of 247 nm. The working curve from 0.5 to 6.0 $\mu\text{g/ml}$ showed a linear line between the concentrations of AH and the peak areas. There was no interference of peak of AH with the ingredients such as methylparaben, ethylparaben in the lotions, milky lotion and creams.

Key Words: acetohexamide, anti-diabetic drug, Japanese Pharmaceutical Affairs Act, cosmetics

(Received May 31, 2005)

1. 緒 言

平成 13 年 4 月 1 日より，化粧品の承認・許可に当たっ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．アセトヘキサミド（AH）は，化粧品基準第 4 条の別表 1¹⁾に収載された化粧品に使用することが禁止されているスルホンアミド系誘導体の一種であり，血糖降下剤として，インスリン非依存型糖尿病の治療に用いられている．AH は第 14 改正日本薬局方²⁾に収載されており，その製剤は，250 mg 及び 500 mg の錠剤が使用されている．AH の分析法としては，血中あるいは赤血球中の AH とその代謝物の hydroxyhexamide の液体クロマトグラフィー^{3~5)}，漢方薬に AH，chlorpropamide，glibenclamide および tolbutamide の血糖降下剤を混入させた成分の高速電気泳動による分析法⁶⁾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，AH の分析法として CAPCELL PAK C_{18} カラムを用いた液体クロマトグラフィーを検討し，市販化粧水，乳液およびクリーム中の AH 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 型カラムオーブン，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．AH 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

AH，メチルパラベン（MP）およびエチルパラベン（EP）は和光純薬製のもの，その他の試薬は試薬特級品を用いた．HPLC 用カラムは資生堂製の CAPCELL PAK C_{18} （粒径 5 μm ，内径 4.6 mm，長さ 25 cm）を購入した．

[#]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

化粧品は市販の化粧水2種類 (A,B), 乳液1種類 (C) およびクリーム2種類 (D,E) を用いた。

AH原液: AH約25 mgを精密に量り, メタノールを加えて溶かし, 正確に100 mlとした。(0.25 mg/ml)

MPおよびEP溶液: MPあるいはEP約25 mgを精密に量り, メタノールを加えて正確に50 mlとした。この液一定量を正確に量り, メタノールで希釈し, 1 ml当たりMPあるいはEP 10.0 μ gを含む溶液を調製した。

AH溶液: AH原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AH50.0 μ gを含む溶液を調製した。

リン酸水素二ナトリウム試液: 無水リン酸水素二ナトリウム7.10 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 (pH5.3): リン酸水素二ナトリウム試液500 mlにリン酸二水素カリウム試液を加え, pHを5.3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, AH溶液1.0 mlを加え, メタノールにて10 mlとし, 試料溶液とした。別に, AH約25 mgを精密に量り, メタノールを加えて溶かし, 正確に100 mlとした。この液5 mlを正確に量り, メタノールにて正確に50 mlとした。この液10 mlを正確に量り, メタノールにて正確に50 mlとし, 標準溶液とした。試料溶液および標準溶液20 μ lにつき, 次の条件で液体クロマトグラフィーを行い, AHのピーク面積 A_T および A_S を求めた。

$$\text{AHの量 (mg)} = \text{AHの秤取量 (mg)} \times A_T / A_S \times 1/5000$$

操作条件

検出器: 紫外吸光度計 (測定波長: 247 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ランを充填した。

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 (pH5.3) / アセトニトリル混液 (3:1)

流量: AHの保持時間が約15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, AH溶液1.0 mlを加え, メタノールにて10 mlとし, 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のメスフラスコに入れ, 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。50 μ g/mlのAH溶液1.0 mlを加え, メタノールにて10 mlとする。この液1.0 mlを共栓遠沈管に入れ, 水1.0 mlを加えて振り混ぜる。更

にヘキサン1.0 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。

3. 結果および考察

3.1 紫外外部吸収スペクトル

10 μ g/mlのAH溶液を用い, 紫外外部吸収スペクトルを測定し, Fig.1に示した。Fig.1から分かるようにAHは247 nmに吸収極大波長を示し, 280 nm付近に吸収の肩を示した。この結果より, 検出波長を247 nmとすることにした。

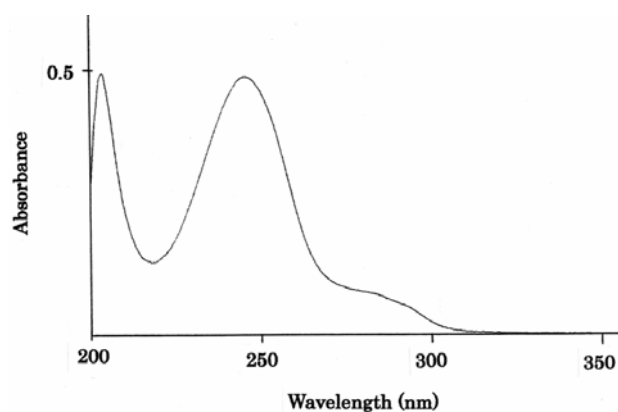


Fig.1 UV spectrum for acetohexamide

3.2 アセトニトリルの影響

50 mmol/lリン酸塩緩衝液 (pH6.0) / アセトニトリル混液中のアセトニトリル濃度を15 ~ 30 %と変化させ, AHの保持時間 (t_R) の変化を測定した。なお, 化粧品には防腐剤の一種であるMPあるいはEPが多用されている。そこで, AHのHPLC条件を決定するに当たり, MPあるいはEP溶液を用いて同時に検討した。その結果をFig.2に示した。

AHの t_R の変化は, 37.1 ~ 5.5分, MPの t_R の変化は,

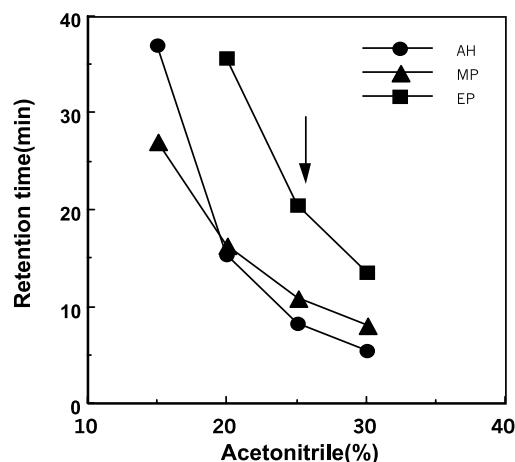


Fig.2 Effect of acetonitrile on retention time of AH, MP and EP

27.1 ~ 8.1分またEPの t_R の変化は、35.6 (20%のアセトニトリル濃度の場合) ~ 13.7分に減少した。測定時間を考慮し、AHの t_R 8.3分を示した25%のアセトニトリルに相当する50 mmol/lリン酸塩緩衝液 (pH6.0) / アセトニトリル混液 (3:1) を用いることにした。

3.3 pHの影響

50 mmol/lリン酸塩緩衝液 / アセトニトリル混液 (3:1) を用い、リン酸塩緩衝液のpHを5.0 ~ 7.0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。

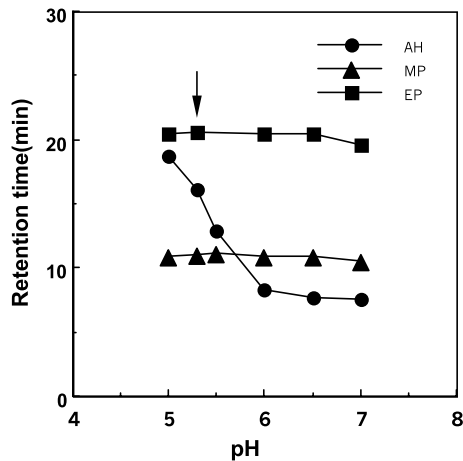


Fig.3 Effect of pH on t_R of AH, MP and EP

リン酸塩緩衝液のpHを5.0 ~ 7.0に変更した時、AHの t_R は18.2 ~ 7.6分と大きく変化した。しかし、MPあるいはEPの t_R はほとんど変化がなかった。このことより、AHの t_R が15.0分を示したpH5.3のリン酸塩緩衝液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、リン酸塩緩衝液 (pH5.3) / アセトニトリル混液 (3:1) を用い、イオン強度を25 ~ 100 mmol/lに変更した。AHの t_R は11.6 ~ 16.4分に変化した。また、カラム温度を25 ~ 45 °Cに変化させたとき、カラム温度が上昇するに従い、各々の t_R はわずかに減少した。この結果、イオン強度として50 mmol/l、カラム温度35 °Cを用いることにした。

3.5 AHの検量線および再現性

AHの濃度を0.5 ~ 6.0 $\mu\text{g/ml}$ とした溶液を調製し、その20 μl を用いて、検量線の作成を行い、Fig.4に示した。

Fig.4から分かるように、AH濃度とピーク面積比の間には $y = -2460.7 + 40528x$ ($r = 1.000$) で示される良好な直線関係が成立した。

AHの0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及び5.0 $\mu\text{g/ml}$ を含む溶液20 μl 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。AH0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及び5.0 $\mu\text{g/ml}$ から得られたピーク面積の平均値 (相対標準偏差) は、それぞれ、18844 (3.97%) および197772 (1.46%) であった。

この結果より、AHの0.5 ~ 6.0 $\mu\text{g/ml}$ は、今回確立した液体クロマトグラフィーで十分測定できることが明らかになった。

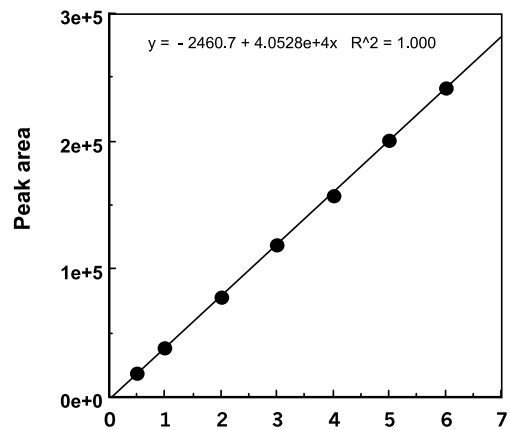


Fig.4 Working curve for acetohexamide

3.6 化粧品への応用

化粧水の測定法の場合、化粧水0.5 gに50 $\mu\text{g/ml}$ のAH溶液1.0 mlを加え、メタノールで10 mlとし、その液20 μl を用いて測定する方法を用いた。化粧水中の賦形剤の影響がなければ、3.5のAH0.5および5.0 $\mu\text{g/ml}$ を用いて得られた再現性で示した結果が得られると考えられる。しかし、クリームの場合、油性の賦形剤が含まれており、それらの賦形剤によるHPLCカラムの劣化が起こることが考えられる。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ことを考えた。その方法として、AHの水 / メタノール混液 (1:1) を調製し、ヘキサンを加えて振り混ぜ、油性物質をヘキサン層に抽出した後、水層中に残留するAHの量を測定する方法を検討した。その方法は以下の様であった。2.5 $\mu\text{g/ml}$ のAHを含む水 / メタノール混液 (1:1) 1.0 mlをクリームに添加し、ヘキサン1.0 mlを加えて振り混ぜた。静置した後、水 / メタノール混液 (1:1) の層中のAHの量を測定した。3回の繰り返し実験の平均値は97.6%であり、相対標準偏差は2.36%であった。この結果より、水 / メタノール混液 (1:1) とヘキサンを加えて振ることにより、油性物質のヘキサン層への除去と同時にAHはほぼ完全に水層中に残留していることが示された。

Fig.5に化粧水B及びクリームDにAHの2.5 $\mu\text{g/ml}$ を添加したときのHPLCクロマトグラムを示した。今回検討した化粧品A ~ Eに使われている賦形剤の妨害もな

く、添加されたAHが測定できることが明らかになった。なお、Fig.5(A)の t_R 9分付近と11分付近のピークは防腐剤のフェノキシエタノールとMPに由来するピークであ

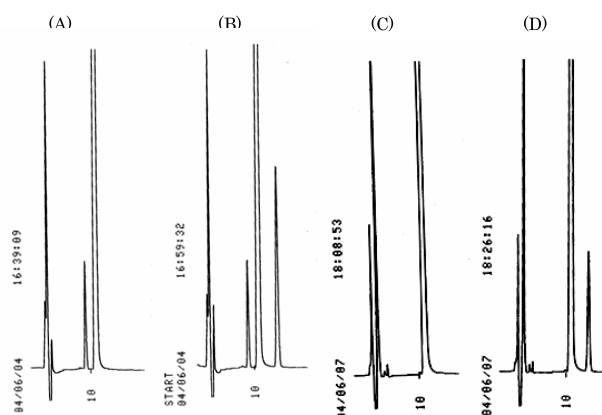


Fig.5 HPLC Chromatograms for lotion and cream

(A): lotion B, (B): lotion B +AH, (C): cream D, (D): cream D+AH

った。同様にFig.5(C)では、 t_R 11分付近のMPに由来するピークが観察された。

Table.1 Recoveries of 2.5 μ g/ml added acetohexamide in cosmetics

	Lotion A	Lotion B	Milky lotion C	Cream D	Cream E
No.1	100.0	94.1	105.2	95.8	91.8
No.2	101.0	102.4	102.8	96.8	99.1
No.3	96.0	101.9	104.3	100.2	96.2
average	99.0	99.5	104.1	97.6	95.7
R.S.D(%)	2.67	4.68	1.16	2.36	3.84

化粧品にAHの最終濃度2.5 μ g/ml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から分かるように、化粧水A、化粧水B、乳液C、クリームDおよびEに0.01%相当量のAHを添加した時のAHの回収率は、それぞれ、99.0%、99.5%、104.1%、97.6%および95.7%であり、今回確立した液体クロマトグラフィーにより十分にAHを分離確認し、定量出来ることが明らかになった。

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.221(2001)
- 3) Takagisi, Y., Sato, K., Tomita, K., Sakamoto, T.: *Yakugaku Zasshi*, **99**, 961-963(1979)
- 4) Kishimoto, M., Kawamori, R., Kamada, T., Inaba, T.: *Drug Metab. Dispos.*, **22**, 367-370(1994)
- 5) Kishimoto, M., Sano, H., Chang, F., Kawamori, R., Kamada, T., Tang, BK., Inaba, T.: *Am. J. Ther.*, **2**, 47-49(1995)
- 6) Ku, YR., Chag, LY., Ho, LK., Lin, JH.: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **33**, 329-334(2003)