

## 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：塩酸シプロヘプタジン

徳永裕司<sup>#</sup>，内野 正Studies for Analyzing the Prohibited Ingredients Such  
As cyproheptadine hydrochloride in CosmeticsHiroshi Tokunaga<sup>#</sup> and Tadashi Uchino

Cyproheptadine hydrochloride (CH) is nominated as the prohibited ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for CH was investigated by HPLC. The lotion or milky lotion of 0.5 g was put into a 10-ml volumetric flask. After adding 1.0ml of CH solution at 50  $\mu\text{g/ml}$  into the volumetric flask, the mixture was made up to 10ml with methanol as the test solution. Creams were proceeded as follows; 0.5 g of cream was put into a 10-ml volumetric flask. After adding 1.0 ml of tetrahydrofuran into the volumetric flask, the mixture was stirred for several minutes and the ingredients of the creams were dissolved. After adding 1.0 ml of CH solution at 50  $\mu\text{g/ml}$  into the volumetric flask, the mixture was made up to 10ml with methanol. This mixture was transferred to a centrifuging tube with a cap and then the tube was centrifuged for 5 minutes at 3000 rpm. The supernatant was used as the test solution. The test solution of 20  $\mu\text{l}$  was analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C<sub>18</sub> column, 4.6  $\times$  250 mm), the mixture of 1% acetic acid with 10 mmol/l sodium octanesulfonate and acetonitrile (11:9) and the detection wavelength of 286 nm. The working curve from 0.5 to 6.0  $\mu\text{g/ml}$  showed a linear line between the concentrations of CH and the peak areas. There was no interference of peak of CH with the ingredients such as methylparaben, ethylparaben in the lotions, milky lotion and creams.

Key Words: cyproheptadine hydrochloride, antihistamine, 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．塩酸シプロヘプタジン（CH）は，化粧品基準第4条の別表1<sup>1)</sup>に収載された化粧品に使用することが禁止されているアミノエーテル型の抗ヒスタミン剤（ジフェンヒドラミン等）以外の抗ヒスタミン剤の一種であり，皮膚疾患に伴う掻痒（湿疹，皮膚炎，皮膚掻痒症，薬疹），じんま疹，アレルギー性鼻炎などの治療薬として用いられている．CHは第14改正日本薬局方<sup>2)</sup>に収載されており，その製剤は，0.04%のシロップ，4 mgの錠剤あるいは1%の散が使用されている．CHの分析法としては，錠剤中のCHの液体クロマトグラフィー<sup>3)</sup>，血清中のCHの液体クロマトグラフィー<sup>4)</sup>，尿中のCHをC<sub>18</sub>のカートリッジで固相抽出した後の抽出物を用いた液体クロマトグラフィー<sup>5)</sup>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，CHの分析法としてCAPCELL PAK C<sub>18</sub>カラムと移動相にオクタンスルホン酸ナトリウムをカウンターイオンとして用いる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CH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．CH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

CH，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

<sup>#</sup>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

C<sub>18</sub> (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(A,B), 乳液1種類(C)およびクリーム2種類(D,E)を用いた。

CH原液: CH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EP10.0 μgを含む溶液を調製した。

CH溶液: CH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CH50.0 μgを含む溶液を調製した。

### 2.3 定量法

化粧水・乳液の場合: 化粧水あるいは乳液約0.5 gを精密に量り, 10 mlのメスフラスコに入れ, メタノールにて10 mlとし, 試料溶液とした。別に, CH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。試料溶液及び標準溶液20 μlにつき, 次の条件で液体クロマトグラフィーを行い, CHのピーク面積A<sub>T</sub>及びA<sub>S</sub>を求めた。

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

操作条件

検出器: 紫外吸光度計(測定波長: 286 nm)

カラム: 内径約4 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リカゲルを充填した。

カラム温度: 35 付近の一定温度

移動相: 10 mmol/lのオクタンスルホン酸ナトリウムの1%酢酸/アセトニトリル混液(11:9)

流量: CHの保持時間が約10分になるように調整する。

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を加えて基材を溶解させる。メタノールにて10 mlとする。この液を共栓遠沈管に入れ, 3000 rpmで5分間遠心分離を行う。上清を試料溶液とする。以下, 化粧水・乳液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

5 μg/mlのCHを含むメタノール溶液を調製し, 紫外外部吸収スペクトルを測定し, Fig.1に示した。Fig.1から分かるようにCHは, 223及び286 nmに吸収極大波長を持つことが分かった。波長223及び286 nmでの吸光度は, それぞれ, 0.565および0.173であった。化粧品には多くの賦形剤が用いられていることから, 紫外外部吸収

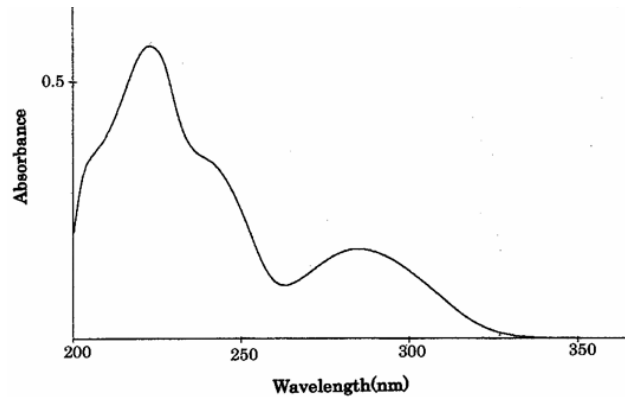


Fig.1 UV spectrum of cyproheptadine hydrochloride

スペクトルによる確認ということを考え, HPLC装置の検出波長を286 nmとすることにした。

### 3.2 移動相について

化粧品には, 防腐剤としてパラベン類が多用されている。そこで, パラベン類との分離・分析を考える必要がある。そこで, 5 μg/mlのCH, MPあるいはEPのメタノール溶液を調製し, それぞれの化合物の保持時間(t<sub>R</sub>)の変化について検討した。

#### 3.2.1 アセトニトリルの影響

カラムとして, CAPCELL PAK C<sub>18</sub>を用い, 移動相の検討を行った。使用溶液としては, 1 ml当たり10 μgのCH, MPおよびEPを含むメタノール溶液20 μlを用いた。なお, 移動相としてカウンターイオンを含まないものを用いた場合, CHのt<sub>R</sub>はvoid volume付近となった。そのため, カウンターイオンを含む移動相を検討した。10 mmol/lのオクタンスルホン酸ナトリウムの1%酢酸/アセトニトリル混液の(13:7)~(1:1)を用い, アセトニトリルの影響を検討した。その結果をFig.2に示した。

アセトニトリル濃度が35~50%と上昇するに従い,

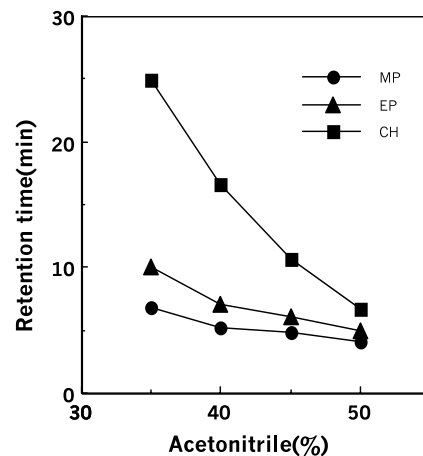


Fig.2 Effect of acetonitrile on retention time of CH, MP and EP

CH, MP および EP の  $t_R$  は, それぞれ, 24.9 ~ 6.7 分, 6.8 ~ 4.1 分および 10.1 ~ 5.0 分と減少した. このことより, 三者の分離が良好で分析時間が短い 10 mmol/l のオクタンスルホン酸ナトリウムの 1% 酢酸 / アセトニトリル混液 (11:9) を用いることにした. その時の CH, MP および EP の  $t_R$  は, それぞれ, 10.7 分, 4.8 分および 6.1 分であった.

### 3.2.2 オクタンスルホン酸ナトリウム濃度の影響

カウンターイオンとして用いたオクタンスルホン酸ナトリウムの濃度を 2.5 ~ 15 mmol/l と変化させたときの CH, MP 及び EP の  $t_R$  の変化を調べ, Fig.3 に示した.

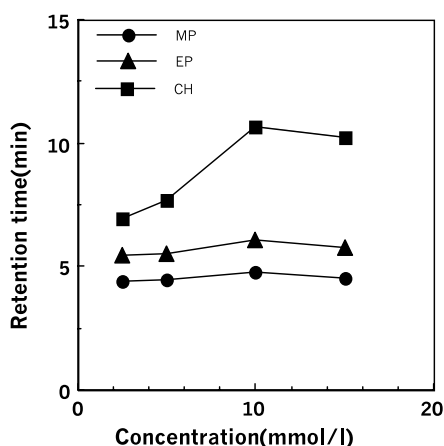


Fig.3 Effect of sodium octanesulfonate on retention time of CH, MP and EP

Fig.3 から分かるようにオクタンスルホン酸ナトリウムの濃度が 5 mmol/l から 10 mmol/l に上昇したとき, CH の  $t_R$  は 7.7 分から 10.7 分と大きく変化し, MP あるいは EP はほとんど変化しないことが分かった. このことより, 10 mmol/l のオクタンスルホン酸ナトリウムの 1% 酢酸 / アセトニトリル混液 (11:9) を用いることにした.

### 3.2.3 カラム温度の影響

移動相として, 10 mmol/l のオクタンスルホン酸ナトリウムの 1% 酢酸 / アセトニトリル混液 (11:9) を用い, カラム温度を 25 ~ 45 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. 分析時のカラム圧あるいは夏場の温度を考慮して, カラム温度 35 を用いることにした.

### 3.3 検量線および再現性

CH の 0.5 ~ 6  $\mu\text{g/ml}$  の溶液 20  $\mu\text{l}$  を用い, 検量線の作成を行った. 使用した CH 濃度とピーク面積の間には良好な原点を通る直線関係が成立した.

また, CH 0.5  $\mu\text{g/ml}$  および 5.0  $\mu\text{g/ml}$  を含む溶液 20  $\mu\text{L}$

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. CH 0.5  $\mu\text{g/ml}$  および 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, 16445 (0.79%) 及び 155382 (4.09%) であった.

この結果より, CH 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.

### 3.4 化粧品への応用

化粧水あるいはクリーム約 0.5 g を精密に量り, 10 ml のメスフラスコに入れ, CH 溶液 1.0 ml を加え, 2.3 の定量法に従い試料溶液を調製した. この液 20  $\mu\text{l}$  を用いて HPLC 測定を行い, Fig.4 に示した.

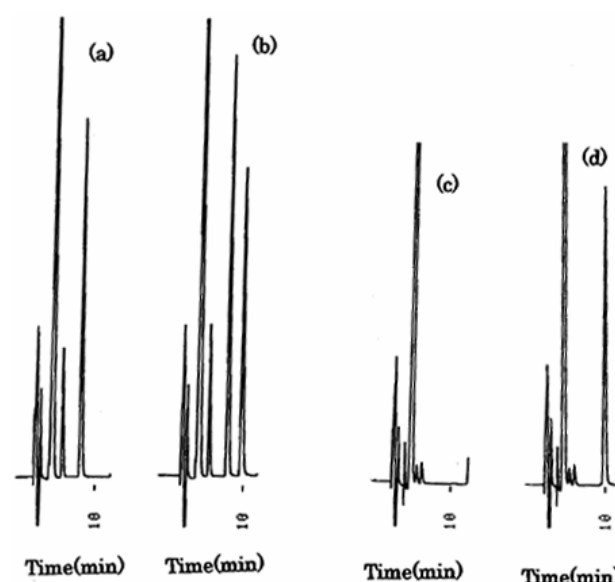


Fig.4 HPLC chromatograms for Lotion B and Cream D  
(a): Lotion B, (b): Lotion B +CH, (c): Cream D, (d): Cream D+CH

Fig.4 から分かるように, 化粧水 B あるいはクリーム D 中の賦形剤は  $t_R$  10 分付近の CH のピークを妨害していないことが分かった. 今回検討した他の 3 種類の化粧品は CH のピークを妨害しないことが明らかになった.

化粧水 A および B, 乳液 C, クリーム D および E のそれぞれ約 0.5 g に CH の 50  $\mu\text{g}$  を添加し, 2.3 の定量法により操作したときに得られた CH の回収率を Table.1 に示した.

Table.1 から分かるように, 化粧品 A ~ E に 0.01% 相

Table.1 Recoveries of 0.01% cyproheptadine hydrochloride added in cosmetics

	Lotion A	Lotion B	Milky lotion C	Cream D	Cream E
No.1	101.7	97.5	101.2	96.7	102.0
No.2	99.1	92.6	101.0	96.3	111.9
No.3	100.5	90.6	99.7	96.1	103.8
average	100.4	93.6	100.6	96.4	105.9
R.S.D.(%)	1.30	3.79	0.81	0.32	4.98

当量のCHを添加した時，CHの回収率は，それぞれ，100.4%，93.6%，100.6%及び96.4%および105.9%であり，今回確立した液体クロマトグラフィーは化粧品中のCHの分離および定量に十分応用でき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.326 (2001)
- 3) Gregory, G.W., Alliger, C.H.: *J. Pharm. Sci.*, **72**, 1212-1213(1983)
- 4) Novak, E.A., Stanley, M., McIntyre, I.M., Hryhorzuk, L.K.: *J. Chromatogr.*, **339**, 457-461(1985)
- 5) Kountourellis, J.E., Ebete, K.O.: *J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.*, **664**, 468-471(1995)