

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： フェニルベンズイミダゾールスルホン酸

徳永裕司[#], 森 謙一郎^{*1}, 大貫奈穂美^{*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}, 吉沢賢一^{*8}, 島村公雄^{*9}, 佐藤信夫^{*10}

Studies for analyzing the restricted ingredients such as phenylbenzimidazole sulfonic acid

Hiroshi Tokunaga[#], Kenichiro Mori^{*1}, Nahomi Onuki^{*1}, Tomio Nosaka^{*2}, Kayo Doi^{*3}, Hiroshi Sakaguchi^{*4}, Makiko Fujii^{*5},
Katuhiro Takano^{*6}, Masato Hayashi^{*7}, Kenichi Yoshizawa^{*8}, Kimio Shimamura^{*9}, Nobuo Sato^{*10}

Phenylbenzimidazol sulfonic acid (PBS) is a kind of sunscreens in cosmetics and is nominated as the restricted ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for PBS was investigated by HPLC. 1.0 g of the lotions with 1.0 % PBS was exactly weighed, put into a 50-mL volumetric flask. Water was added to make exactly 50 mL and this mixture was used as the sample solution. On the other hand, 1.0 g of the creams with 1.0 % PBS was exactly weighed, put into a beaker. After adding 1 mL of tetrahydrofuran and dissolving the cream, that mixture was transferred to a 50-mL volumetric flask. And then the beaker was rinsed with 1 mL of tetrahydrofuran and the rinsed solution was put together into the volumetric flask. After adding water to the volumetric flask to make exactly 50 mL, this mixture was used as the sample solution. If necessary, the mixture was filtrated with a membrane filter (0.45 μ m). 5.0 mL of the sample solution was pipetted and put into a 200-mL volumetric flask. After adding water to make exactly 200 mL, 20 μ L of this solution was analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C₁₈ column, 4.6 mm i.d. \times 250 mm), the mixture of 40 mmol/L acetic buffer (pH3.4) and acetonitrile (3:1) with 0.8 mmol/L dodecyltrimethyl ammonium bromide and the detection wavelength of 305 nm. The working curve from 0.5 to 20.0 μ g/mL showed a linear line between the concentrations of PBS and the peak areas. There was no interference of peak of PBS from the lotion and cream.

Key Words: phenylbenzimidazol sulfonic acid, sunscreen, Japanese Pharmaceutical Affairs Act, lotion, cream

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。化粧品基準第4条の別表³⁾に化粧品に使用することのできる紫外線吸収剤が定められている。この中でフェニルベンズイミダゾールスルホン酸 (PBS) は、粘膜に使用されることがない化粧品の場合、その最大配合量は化粧品100 g中

に3 gまでに制限されている。化粧品中のPBSの定量法としては、紫外線吸収剤入りスプレー中のbenzophenone-4, terephthalylidene dicamphor sulfonic acidおよびPBSの高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法²⁾あるいはサンケア化粧品中の16種類の紫外線吸収剤のHPLC法³⁾が報告されている。

今回、著者らは、化粧品に使用が認められているPBSの化粧水およびクリーム中での分析法としてCAPCELL PAK C₁₈ カラムを用いたHPLC法を検討したので報告する。

2. 実験

2.1 装置

高速液体クロマトグラフ装置は、島津製LC・10AT_{VP}型ポンプ、島津製CTO・10AS_{VP}型カラムオープン、島津製SPD・10AV_{VP}型紫外可視検出器、島津製SIL・10AD_{VP}型オートサンプラーおよび島津製C・R8A型クロマトパックを連結して用いた。

[#]To whom correspondence should be addressed: Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan: Tel:03-3700-1141 ext.253; Fax: 03-3707-6950; E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

^{*1} 東京都健康安全研究センター, ^{*2} 埼玉県衛生研究所, ^{*3} 神奈川県衛生研究所, ^{*4} 北里大学理学部, ^{*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)中央研究所, ^{*9} カネボウ化粧品(株)製品保証研究所, ^{*10} コーセー(株)研究本部

2.2 試薬および試液

PBSはカネボウ化粧品(株)より提供を受けた。臭化ドデシルトリメチルアンモニウム (DTAB) は東京化成(株)より購入した。液体クロマトグラフ用カラムのCAPCELL PAK C₁₈は資生堂より購入した。PBS1.0%および0.1%を含む化粧水およびクリームをカネボウ化粧品(株)で試作し、試験に供した。その他の試薬は試薬特級を用いた。

PBS標準溶液：PBS約0.1 gを精密に量り、2 mol/L水酸化ナトリウム試液2 mLに溶かし、水を加えて50.0 mLとした。

10 mmol/L・DTAB試液：DTAB 0.31 gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に100 mLとした。

0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸：酢酸12.01 gを正確に量り、水を加えて正確に1 Lとした。この液100 mLと10 mmol/L・DTAB試液40 mLを正確に量り、500 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて500 mLとした。

0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸ナトリウム試液：酢酸ナトリウム16.41 gを正確に量り、水を加えて溶かし、正確に1 Lとした。この液100 mLと10 mmol/L・DTAB試液40 mLを正確に量り、500 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて500 mLとした。

0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸塩緩衝液 (pH 3.4)：0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸500 mLに0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸ナトリウム試液を加え、pHを3.4に調整した。

2.3 定量法

化粧水の場合には、試料約1 gを精密に量り、50 mLメスフラスコに入れ、水を加えて50 mLとした。この液5 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて200 mLとし、試料溶液とした。クリームの場合には、試料約1 gを精密に量り、ピーカーに入れ、テトラヒドロフラン1 mLを加え基剤を懸濁させ、50 mLメスフラスコに入れた。テトラヒドロフラン1 mLでピーカーを洗い、洗液をメスフラスコに合わした。ピーカーを水で洗いながらメスフラスコに移し、水を加えて50 mLとした。この液5 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて200 mLとし、試料溶液とした。必要なら、メンブランフィルター (0.45 μm) を用いてろ過し、最初のろ液2 mLを除き、次のろ液を試験溶液とした。試料溶液20 μLを液体クロマトグラフ装置に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積を測定し、別に作成した検量線から試験溶液中のフェニルベンズイミダゾールスルホン酸の濃度A (μg/mL) を求め、次式により試料100 g中の含有量を算出した。

試料100 g中のフェニルベンズイミダゾールスルホン酸の含有量 (mg) = A/試料採取量 (g) × 1/50

検量線の作成：フェニルベンズイミダゾールスルホン酸標準溶液を水で希釈し、1 mL当たりフェニルベンズイミダゾールスルホン酸0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0および6.0 μgを含む標準系列をつくり、各20 μLを液体クロマトグラフ装置に注入し、得られたそれぞれのピーク面積と濃度から検量線を作成した。

操作条件

検出器：紫外吸光度計 (測定波長：305 nm)

カラム：CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm)

移動相：0.8 mmol/LのDTABを含む40 mmol/L酢酸

塩緩衝液 (pH 3.4)/アセトニトリル混液 (3 : 1)

カラム温度：35 付近の一定温度

流量：1 mL/min

3. 結果および考察

最初、PBSのHPLC法による検討をカウンターイオンを用いない方法で行った。移動相として、40 mmol/L酢酸塩緩衝液 (pH 5.1)/アセトニトリル混液 (9 : 1) を用いて検討し、そのクロマトグラムをFig.1に示した。

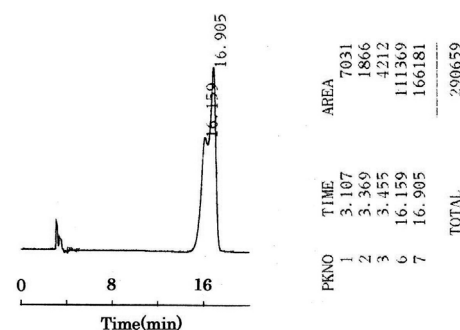


Fig.1 HPLC chromatogram for phenylbenzimidazole sulfonic acid
HPLC conditions: detection - spectrophotometer (wavelength 305 nm), column-CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm), column temp.-35, mobile phase- the mixture of 40 mmol/L acetic buffer (pH 5.1) and acetonitrile(9:1), flow rate- 1 mL/min

Fig.1のHPLCクロマトグラムより分かるようにPBSのピークが常に2本 (保持時間16.2分と16.9分) に分離することが観察された。これはこの測定条件でPBSのイオン化の違いにより2種類のイオン化の異なる化合物が溶液中で生成し、あたかもPBSの不純物のような挙動を示したものと考えられた。そこでピークを1本にする試みとして、低分子のカウンターイオンであるテトラメチルアンモニウムヒドロキッドあるいはテトラエチルアンモニウムヒドロキッドの0.5 mmol/Lを含有する40 mmol/L酢酸塩緩衝液 (pH 5.1)/アセトニトリル混液 (9 : 1) を調製して検討したが、保持時間 (t_R) も変化せず、2本のピークが観察され、この化合物に対するカウンターイオンとしての作用がテトラメチルアンモニウムヒドロキッドあるいはテトラエチルアンモニウムヒド

オキッドではないものと考えられた。

そこで、長い炭素鎖を持つDTABを用いて検討した。0.2 mmol/L・DTABを含む40 mmol/L酢酸 (pH 3.1)/アセトニトリル混液 (9 : 1) を調製し、PBSの試料溶液 20 μ Lを注入して測定したが、PBSのピークを60分後でも検出することができなかった。そこで、0.2 mmol/L・DTABを含む40 mmol/L酢酸 (pH 3.1)/アセトニトリル混液 (3 : 1) を調製して検討した。その結果をFig.2に示した。

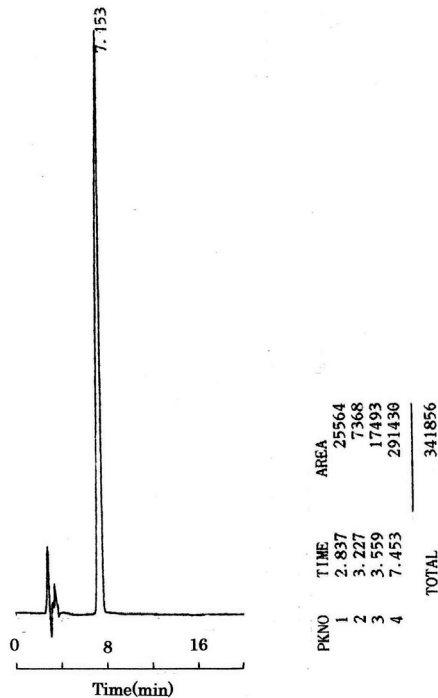


Fig.2 HPLC chromatogram for phenylbenzimidazole sulfonic acid
HPLC conditions: detection - spectrophotometer (wavelength 305 nm), column-CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm), column temp.-35, mobile phase- the mixture of 40 mmol/L acetic buffer (pH 3.1) and acetonitrile(3:1) having 0.2 mmol/L dodecyl trimethyl ammonium bromide, flow rate- 1 mL/min

Fig.2から分かるよう t_R 7.2分にPBSのピークを検出することができた。この結果、カウンターイオンとして、DTABを用いて以下の検討を行った。

3.1 移動相のアセトニトリルの影響

移動相として、0.2 mmol/L・DTABを含む40 mmol/L酢酸 (pH 3.1)/アセトニトリル混液 (9 : 1)~(3 : 1) を調製し、PBSの t_R の変化を検討した。その結果をFig.3に示した。

Fig.3から分かるように、アセトニトリルが増えるに従い、PBSの t_R は減少した。しかし、矢印で示したアセトニトリルの17.5%の所では、PBSのピーク幅は大きくなり、20%の所では肩として示される2本のピークに分

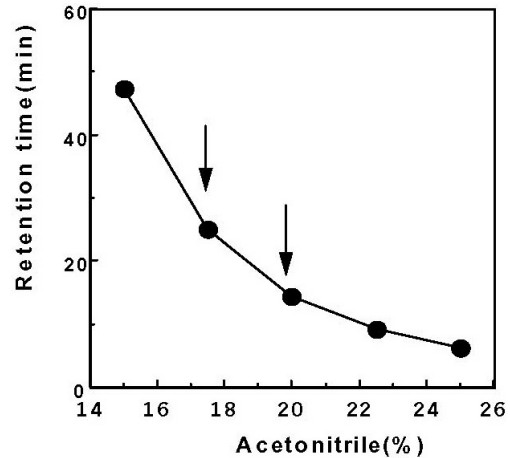


Fig.3 Effect of acetonitrile

離された。

3.2 ドデシルトリメチルアンモニウムブロミドの濃度の影響

40 mmol/L酢酸 (pH 3.1)/アセトニトリル混液 (4 : 1) に0.2 ~ 0.8 mmol/L・DTABを含む溶液を調製し、PBSの t_R の変化を検討した。0.2 ~ 0.8 mmol/L・DTABのPBSの t_R の変化への影響をFig.4に示した。

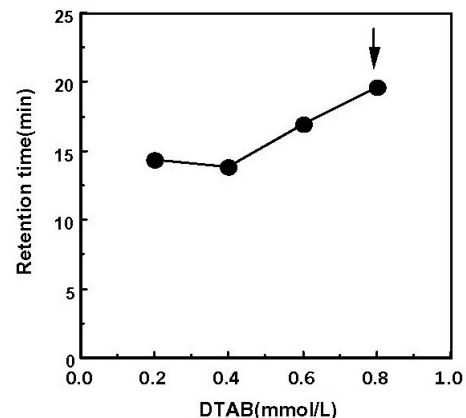


Fig.4 Effect of dodecyltrimethylammonium bromide

0.2及び0.4 mmol/L・DTABを使用した場合、ピークに肩が認められた。0.6 mmol/Lの使用で肩は消失したがピークが幅広くなった。0.8 mmol/Lの使用では1本のピークとなった。そのHPLCクロマトグラムをFig.5に示した。

この結果より、0.8 mmol/L・DTABをカウンターイオンとして用いることにした。

3.3 40 mmol/L 酢酸塩緩衝液のpH

40 mmol/L酢酸 (pH3.1) のpHを変更したとき、PBSの t_R の変化への影響を検討した。移動相として、0.8 mmol/L・DTABを含む40 mmol/L酢酸塩緩衝液

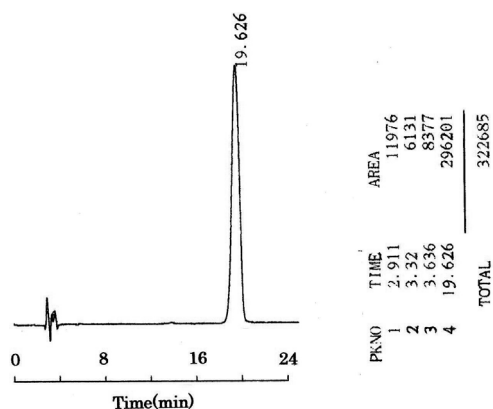


Fig.5 HPLC chromatogram for phenylbenzimidazole sulfonic acid
HPLC conditions: detection - spectrophotometer (wavelength 305 nm), column-CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm), column temp.-35 , mobile phase- the mixture of 40 mmol/L acetic buffer (pH 3.1) and acetonitrile(4:1) having 0.8 mmol/L dodecyl trimethyl ammonium bromide, flow rate- 1 mL/min

(pH3.4)/アセトニトリル混液(4:1)を調製してPBSの t_R を測定したが、PBSの t_R 値が約40分となったため、0.8 mmol/L・DTABを含む40 mmol/L酢酸塩緩衝液/アセトニトリル混液(3:1)を用い、酢酸塩緩衝液のpHを3.1~4.2と変化させて検討した。その結果をFig.6に示した。

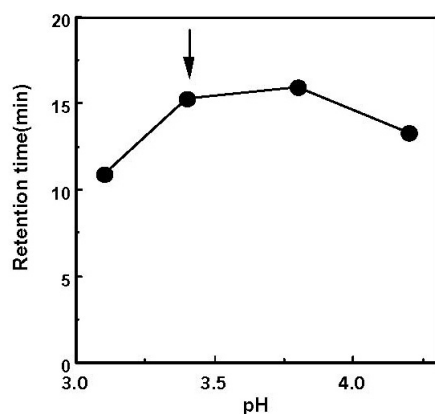


Fig.6 Effect of pH

Fig.6から分かるように、pH 3.4~3.8の間はほぼ一定のPBSの t_R を与えることが明らかになった。このことより、40 mmol/L酢酸塩緩衝液(pH 3.4)/アセトニトリル混液(3:1)を用いることにした。

3.4 検量線

PBS0.5~6.0 $\mu\text{g/mL}$ の溶液あるいは0.5~20 $\mu\text{g/mL}$ の溶液20 μL を用いて検量線を作成した。原点を通る検量線が得られた。PBS 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 及び5.0 $\mu\text{g/mL}$ の溶液20 μL を用い、6回の繰り返し注入を行い、そのピーク

面積を求めた。それらの平均値は、それぞれ、28104及び292786であり、それらの相対標準偏差は0.81及び0.66%であった。

3.5 化粧水及びクリームへの応用

3.5.1 化粧水について

化粧水(ブランク)1.0 gを正確に量り、50 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて50 mLとした。この液5 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて200 mLとした。同様に、1.0% PBSを含む化粧水1.0 gを正確に量り、50 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて50 mLとした。この液5 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて200 mLとした。これらの液20 μL を用い、HPLC法で測定を行い、その結果をFig.7に示した。

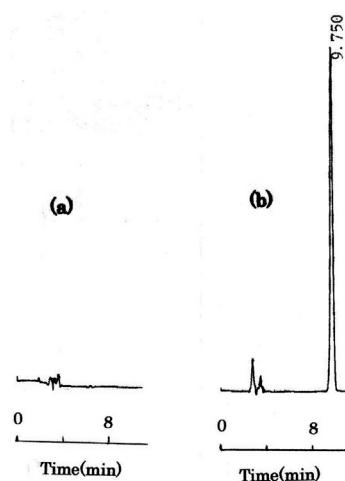


Fig.7 HPLC chromatogram for Lotion(Blank:a) and Lotion with Phenylbenzimidazole sulfonic acid

HPLC conditions: detection - spectrophotometer (wavelength 305 nm), column-CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mm i.d. × 250 mm), column temp.-35 , mobile phase- the mixture of 40 mmol/L acetic buffer (pH 3.4) and acetonitrile(7:3) having 0.8 mmol/L dodecyl trimethyl ammonium bromide, flow rate- 1 mL/min

Fig.7(a)から分かるように化粧水中にはPBSの t_R 位置の9.75分にピークを妨害する賦形剤がないことが確認できた。別に、化粧水(ブランク)にPBSの一定量を添加した試料溶液(PBSとして1 mL当たり5 μg を含む溶液)の3個を調製し、HPLC法で測定したとき、その回収率は、それぞれ、99.6、98.4及び99.0%であり、それらの平均値は99.0%であった。この結果より、化粧水の希釈液に添加されたPBSは何の妨害もなく定量出来ることが明らかになった。

3.5.2 クリームについて

クリーム(ブランク)約1.0 gを精密に量り、THF1

mLに懸濁させ、50 mLメスフラスコに入れ、THF 1 mLで容器を洗い、洗液をメスフラスコに合わした。ピーカーを水で洗いながらメスフラスコに移し、水を加えて50 mLとした。この液5 mLを正確に量り、200 mLのメスフラスコに入れ、水を加えて200 mLとした。この液20 μ Lを用いて測定したとき、Fig.7(a)で示したのと同様にHPLCクロマトグラム上にはPBSの t_R 位置(9.75分)にピークを認めることができなかった。別に、クリーム(ブランク)約1.0 gを精密に量り、PBSの標準原液5.0 mLを添加した試料溶液を調製し、その液20 μ Lを用いてHPLC法での測定を行った。別々に調製した3検体中のPBSの回収率は、それぞれ、99.0、99.7、98.1%であり、それらの平均値は98.9%であった。この結果より、クリーム中の賦形剤の影響もなくPBSが測定できることが明らかになった。

3.6 製品への応用

化粧水及びクリーム中のPBSの測定を行った。試料の調製法は2.3の定量法に従って行った。その結果をTable.1に示した。

Table.1 . Amount(%) of PBS in Cosmetics

	labeled amount (%)	analytical value(%)			average(%)	R.SD(%)
Lotion	0.1	0.102	0.102	0.101	0.102	0.93
	1.0	1.021	1.033	1.023	1.026	1.35
Cream	0.1	0.103	0.104	0.103	0.103	1.71
	1.0	1.000	1.002	0.995	0.999	0.31

0.1%及び1.0%化粧水の3回の測定結果の平均値は、それぞれ、0.102%及び1.026%であり、相対標準偏差は0.93%及び1.35%であった。また、0.1%及び1.0%クリームの3回の測定結果の平均値は、それぞれ、0.103%及び0.999%であり、相対標準偏差は1.71%及び0.31%であった。

4. まとめ

今回確立した方法は、化粧水及びクリーム中の0.1%及び1.0%のPBSの測定に応用できることが明らかになった。

文 献

- 1) Notification No.331 dated on September 9, 2000
- 2) Chisvert A., Salvador A.: J.Chromatogr. A, **977**, 277-280 (2002)
- 3) Schakel D.J., Kalsbeek D., Boer K.: J.Chromatogr. A, **1049**, 244-247 (2004)