

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の紫外線吸収剤
2-[4-(ジエチルアミノ)-2-ヒドロキシベンゾイル] 安息香酸ヘキシルの分析

五十嵐良明[#], 吉沢賢一^{*1}, 島村公雄^{*2}, 高野勝弘^{*3}, 小島 尚^{*4}, 佐藤信夫^{*5}, 林 正人^{*6},
大貫奈穂美^{*7}, 宮沢法政^{*8}, 坂口 洋^{*9}, 藤井まき子^{*10}, 徳永裕司

Analysis of Ultraviolet Absorber Benzoic acid, 2-[4-(Diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-,
Hexyl Ester in Cosmetics by High-performance Liquid Chromatography

Yoshiaki Ikarashi[#], Ken-ichi Yoshizawa^{*1}, Kimio Shimamura^{*2}, Katsuhiro Takano^{*3}, Takashi Kojima^{*4},
Nobuo Sato^{*5}, Masahito Hayashi^{*6}, Nahomi Oonuki^{*7}, Norimasa Miyazawa^{*8}, Hiroshi Sakaguchi^{*9},
Makiko Fujii^{*10} and Hiroshi Tokunaga

The purpose of this study was to examine whether benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-, hexyl ester (Uvinul[®] A Plus, UAP) could be analyzed using our method that was reported in *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **125**, 65–71 (2007). Ultraviolet absorbers were extracted from cosmetics with tetrahydrofuran (THF) by ultrasonication. A sample solution was injected into the high-performance liquid chromatography (HPLC). The separation was realized using an ODS column with a mixture of THF and water that acted as the mobile phase. The peak corresponding to UAP was close to that attributed to 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate (EDB) in the chromatogram; however, UAP was selectively detected at the wavelength of 354 nm, at which EDB had no absorption. A linear relation was obtained between the peak areas and the concentrations of all the ultraviolet absorbers in the range of 2–100 µg/ml. The lowest concentration of quantification (LOQ) of UAP in the injection solution was 0.08 µg/ml in the gradient elution mode. At the isocratic mode, the LOQ of UAP was 0.01 µg/ml. The method used enabled high-percentage recovery of UAP from creams or milky lotions and showed reproducibility.

Keywords: ultraviolet absorber, benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-, hexyl ester, cosmetics, HPLC

緒 言

化粧品に使用する紫外線吸収剤は種類、量ともに規制されており、その配合量が守られているかどうかを判断するための分析法を設定することが必要である。2-[4-(ジエチルアミノ)-2-ヒドロキシベンゾイル] 安息香酸ヘキシル (CAS name: benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)

-2-hydroxybenzoyl]-, hexyl ester, CAS No.: 302776-68-7, Trade name: Uvinul[®] A Plus, C₂₄H₃₁NO₄, 分子量: 397.52, 以下、UAPと略す) は新規に開発されたUVA紫外線吸収剤であり、日焼け止めやスキンケア製品へ使用が考えられている。UAPは2005年1月にサンスクリーン製品に最大10%の濃度まで配合できるという認可を欧州委員会から受け¹⁾、日本においても10月に、粘膜に使用されることがない化粧品については、洗い流す、流さないにかかわらず100 g中に最大10 gまで配合できる、として化粧品基準のポジティブリストに収載された²⁾。

化粧品中の紫外線吸収剤の分析は一般的に液体クロマトグラフィー (HPLC) が用いられ、多成分の同時分析法も報告されている^{3~6)}。我々も先に9種類の紫外線吸収剤の分析法について報告しており⁷⁾、今回はUAPとそれらの紫外線吸収剤との分離及び同時分析法を検討

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.255, Fax: 03-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

^{*1} ポーラ化成工業, ^{*2} カネボウ化粧品, ^{*3} 日本化粧品工業連合会, ^{*4} 神奈川県衛生研究所, ^{*5} コーセー, ^{*6} 資生堂, ^{*7} 東京都健康安全研究センター, ^{*8} 埼玉県衛生研究所, ^{*9} 北里大学, ^{*10} 昭和薬科大学

した。

実験方法

1. 試薬

UAPはBASF社より得た。メーカー情報によるとUAPの純度は99.7%であり、このまま精製せず標準品として用いた。パラメトキシケイ皮酸2-エチルヘキシル (2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate, EMC), 2,4-dihydroxybenzophenone (DHB), 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone (DHDMB)及び2-ethylhexyl salicylate (ES)は東京化成工業から購入した。Ethyl *p*-aminobenzoate (EAB), 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone (THB), 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (HMB), 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate (EDB) 及び 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane (BMB)は和光純薬工業から購入した。テトラヒドロフラン (THF)は和光純薬工業製のHPLC用を用いた。各試薬は約0.1 gを量りとり、THFに溶解して50 mlとしたものを標準原液 (約2.0 mg/ml)とし、希釈して用いた。

2. 試料

UAPを1%または0.1%配合したクリーム製剤 (CR-1, CR-2)及び乳液製剤 (EM-1, EM-2)を検討用に製造し用いた。なお、クリーム製剤には2-シアノ-3,3-ジフェニルプロパ-2-エン酸2-エチルヘキシルエステルを、乳液製剤にはEMCをそれぞれ5%ずつ配合した。

3. 器具及び装置

高速液体クロマトグラフ (HPLC): 島津製作所製LC-10AD型ポンプ2台にSPD-M20A型フォトダイオードアレイ検出器, CTO-10AC型カラムオーブン, SIL-10AD型オートサンプラーを連結して用いた。島津製作所製LCワークステーション (LC solution)によりHPLCのシステム制御, データ収集及び解析を行った。

超音波洗浄機: シャープマニファクチャリングシステム製UT205型

4. 試験操作

4.1 試験溶液の調製

試料約0.5 gを量りとり、THF約16 mlを加えて10分間超音波処理し、さらにTHFを加えて正確に20 mlとした。この溶液を10000 rpmで10分間遠心した後、上清を分取し、この1 mlをとり、THFを加えて正確に10 mlとしたものを試験溶液とした。

4.2 定量

試験溶液10 μ lをHPLCに注入し、得られたクロマトグ

ラム上のUAP及び各紫外線吸収剤の保持時間に相当する位置のピーク面積を求めた。紫外線吸収剤の混合標準溶液 (2~100 μ g/ml)を用いてあらかじめ作成しておいた検量線から、試験溶液中の濃度 (μ g/ml)を求め、試料中の含有量 (%)を算出した。

HPLC条件

カラム: CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm, 粒径5 μ m, 資生堂)

カラム温度: 40°C

移動相: A液: 水, B液: THF

流速: 1.0 ml/min

検出器: フォトダイオードアレイ検出器 (354及び310 nm)

リニアグラジエントの条件

min	A (%)	B (%)
0	60	40
30	30	70
40	30	70
40.1	60	40
50	60	40

結果と考察

1. HPLC条件の検討

1-1. グラジエント条件

先の報告⁷⁾ではカラムにCAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm), 移動相に水とTHFの混合液をグラジエントで用いた。本条件でUAPが他の9種の紫外線吸収剤と分離するかどうか検討した。検出波長310 nm及び354 nmにおける紫外線吸収剤10種の混合標準液のクロマトグラムをFig. 1に、保持時間をTable 1に示した。UAPのピークは19.7分に出現した。

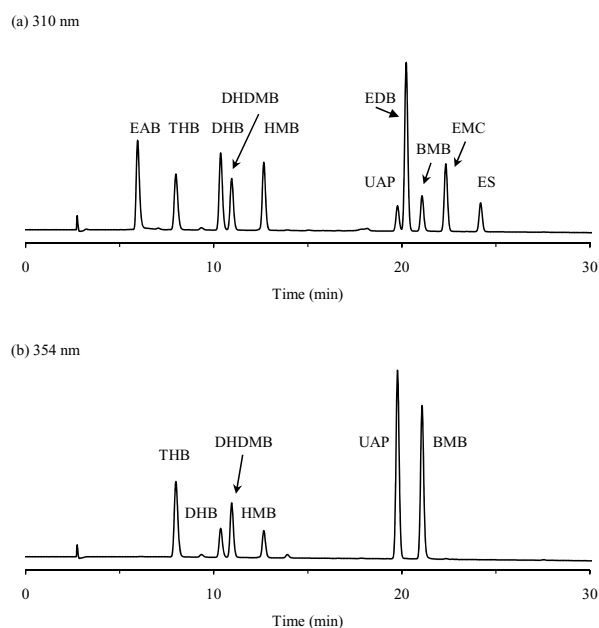
紫外線吸収剤の分析において、310 nmの検出波長は多くの紫外線吸収剤をバランスよく検出できる波長として使われている⁵⁻⁷⁾。しかし、UAPの吸収スペクトルは354 nm付近に吸収極大を持ち (Fig. 2), 310 nmで検出したとき同じ濃度でのピーク面積はこれら試験物質の中で最低であった。一方、354 nmで検出した場合はUAP及びBMBのピークは高くなったが、EMCは非常に小さく、EA及びESのピークは検出しなかった。EDBはUAPに近い位置に溶出するが354 nmにはほとんど吸収がなく (Fig. 2), 354 nmで検出した際にEDBをUAPと同等のピークの大きさで検出するには1000倍の濃度が必要であった。以上のことから、UAPを定量するには検出波長として354 nmを用いるのが適当と思われた。

次に、移動相をTHF-水混合系からアセトニトリル-水混合系のグラジエント条件に変更して、先と同様な

Table 1 Abbreviations and retention times of the 10 ultraviolet absorbers tested

Chemical	Abbreviation	Retention time (min)
Ethyl <i>p</i> -aminobenzoate	EAB	5.9
2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenone	THB	7.7
2,4-Dihydroxybenzophenone	DHB	10.0
2,2'-Dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone	DHDMB	10.9
2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone	HMB	12.6
Benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-, hexyl ester	UAP	19.7
2-Ethylhexyl <i>p</i> -dimethylaminobenzoate	EDB	20.2
4- <i>tert</i> -Butyl-4'-methoxydibenzoylmethane	BMB	21.0
2-Ethylhexyl- <i>p</i> -methoxycinnamate	EMC	22.3
2-Ethylhexyl salicylate	ES	4.2

The HPLC conditions are described in Fig. 1

**Fig. 1** HPLC chromatogram of 10 ultraviolet absorbers

The concentration of each chemical in the injection solution was approximately 25 $\mu\text{g/ml}$.

HPLC column: CAPCELL PAK C18 UG120 (4.6 mm i.d. $\times$ 250 mm); column temperature: 40°C; mobile phase: solvent A = water, solvent B = THF (gradient timetable is described in the text); flow rate: 1.0 ml/min; injection volume: 10 μl .

EAB = ethyl *p*-aminobenzoate

THB = 2,2',4,4'-tetrahydroxybenzophenone

DHB = 2,4-dihydroxybenzophenone

DHDMB = 2,2'-dihydroxy-4,4'-dimethoxybenzophenone

HMB = 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone

UAP = benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-, hexyl ester (Uvinul® A Plus)

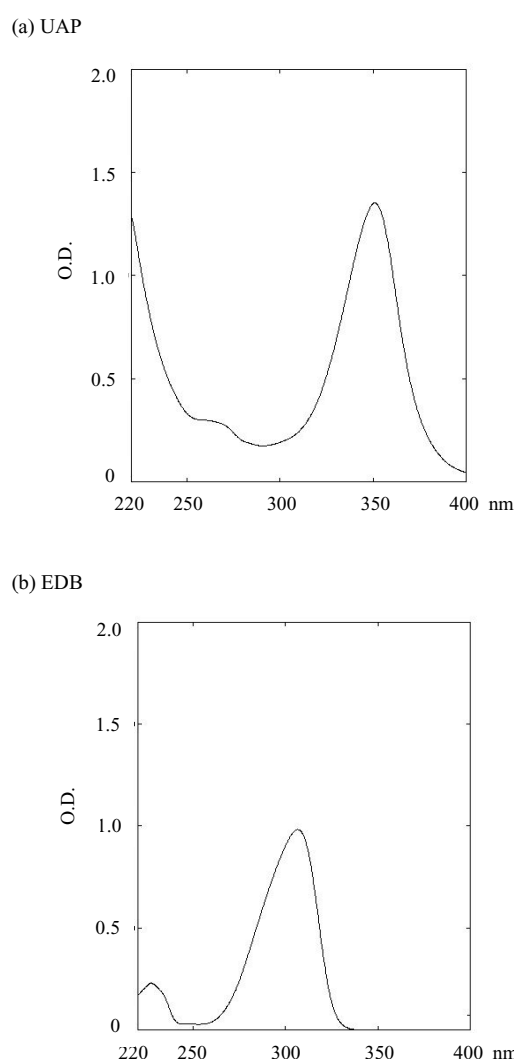
EDB = 2-ethylhexyl *p*-dimethylaminobenzoate

BMB = 4-*tert*-butyl-4'-methoxydibenzoylmethane

EMC = 2-ethylhexyl-*p*-methoxycinnamate

ES = 2-ethylhexyl salicylate

分離が可能か検討した。ほとんどの物質の保持時間は長くなり、一部の物質では保持時間の逆転が見られた。310 nmで検出した場合、EDBはUAPとは離れるがEMCと重なった。354 nmで検出したときでもUAPとBMBと

**Fig. 2** Ultraviolet absorption spectra of UAP and EDB in tetrahydrofuran

The concentrations of UAP and EDB were 12.95 $\mu\text{g/ml}$ and 10.21 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

の分離度はTHFを移動相としたときよりも悪かった (Fig. 3)。以上のことから、検出波長以外のHPLC条件は先の報告⁷⁾のままでよいとした。

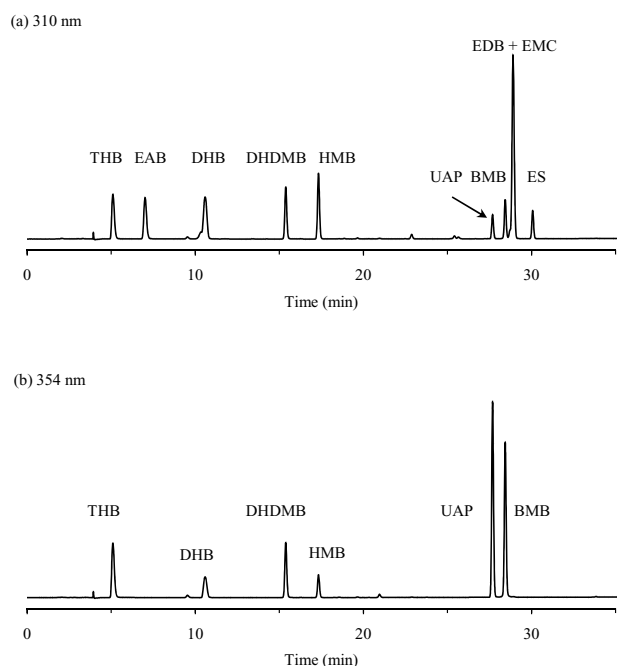


Fig. 3 HPLC chromatogram of ultraviolet absorbers using a gradient mixture of acetonitrile and water as the mobile phase. The gradient timetable is the same as that described in the text. Other HPLC conditions are the same as those described in Fig. 1.

1-2. イソクラチック条件

UAPだけを分析対象にするなら、移動相をイソクラチックな組成で分析した方がカラムの安定化を省略できることから、分析時間も短く安定した結果が得られるはずである。THF-水混液を用いたとき、THF濃度が50%でUAPの保持時間は14.1分、40%では24.3分、30%では48分となった。50% THF-水混液を移動相とした時の10種の紫外線吸収剤のHPLCクロマトグラムをFig. 4に示した。EABのピークが溶媒ピークに近く、DHBとDHDMBの分離が不十分になったが、ESの最終溶出時間はグラジエント条件と変化なかった。そのため、カラムの安定化を省略化できることから、分析時間は短縮される。本移動相で化粧品中の他成分が全部溶出してカラム洗浄の必要がないのであれば、UAPの定量は十分可能である。

次に、アセトニトリル-水混液を用いて検討した。80%アセトニトリル溶液でUAPの保持時間は10.3分、75%溶液で14.5分、70%溶液では21.2分となり、50%溶液でUAPは溶出しなかった。移動相にアセトニトリル溶液(80%, 75%及び70%)をイソクラチック条件で用いた場合でも、UAPはBMBを初めとした他のピークと良好に分離した(データ未掲載)。

2. 検量線と定量限界

THF系溶液を移動相としてグラジエント条件で分析した時、UAPは他の紫外線吸収剤と同様に2~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

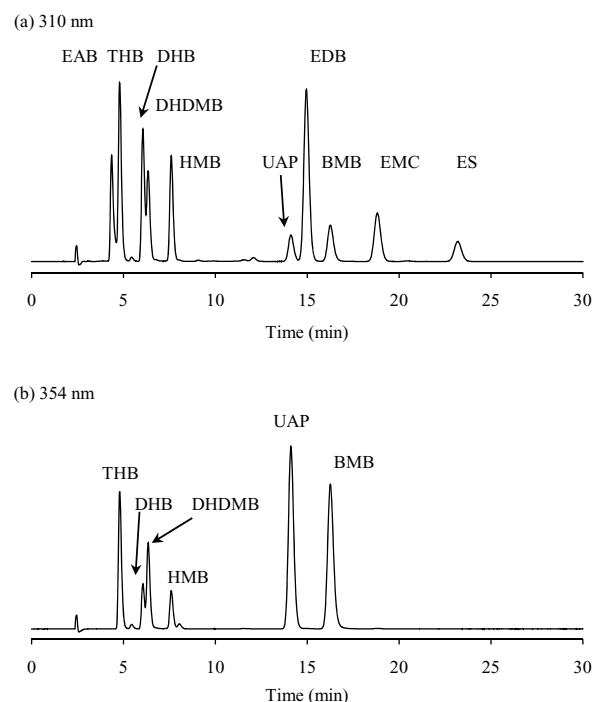


Fig. 4 HPLC chromatogram of ultraviolet absorbers when a mixture of THF and water (50:50) is used as the mobile phase. The concentration of each chemical in the injection solution was approximately 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

mlの濃度範囲でピーク面積との間に良好な直線関係が得られた(Fig. 5)。UAPについてクロマトグラム上のピークとベースラインのシグナル-ノイズ(S/N)比をもとに検出限界値及び定量限界値を求めた。S/N = 3を検出限界とした場合、試験溶液中のUAP濃度は0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、S/N = 10を定量限界とした場合は0.08 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。これを本法で実施した場合での試料中の濃度に換算すると、検出限界は0.0008%, 定量限界は0.0032%になる。この値は規制値を超えているかどうかの判断には十分な検出感度であった。

イソクラチック条件ではTHF及びアセトニトリル系移動相とも同濃度範囲においてピーク面積との間に良好な直線関係が得られた。イソクラチック条件ではベースラインが安定化し、UAPの検出限界濃度は0.004~0.007 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、定量限界濃度は0.01~0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

本イソクラチック条件での注入再現性を確認するため2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 及び25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のUAP標準液を5回繰り返し注入し、ピーク面積を測定した。Table 2に示すように、UAPのピーク面積のRSDは0.3~0.6%と再現性良く検出された。

3. 添加回収試験と定量再現性

化粧品中の成分の定量では、THFを抽出溶媒として加え超音波処理して抽出し、そのまま試験溶液とすることが多い^{5,7)}。ここでも同様の抽出法を用いてUAP添加

Table 2 Reproducibility of the peak area of UAP by repeating the injection test

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Peak area (n=5)		
	Mean	SD	RSD (%)
2.59	134453	540	0.40
25.9	1360456	5381	0.40

Table 3 Recovery of UAP from creams and milky lotions

Exp. 1					
Sample	Code	Added (%)	Found (%)*		
			Mean	SD	RSD (%)
Milky lotion	EM-1	1	0.985	0.002	0.17
	EM-2	0.1	0.101	0.000	0.29
Cream	CR-1	1	0.993	0.002	0.25
	CR-2	0.1	0.099	0.000	0.33

*n = 5.

Exp. 2					
Sample	Code	Added (%)	Found (%)**		
			Mean	SD	RSD (%)
Milky lotion	EM-1	1	1.041	0.006	0.55
	EM-2	0.1	0.104	0.001	0.91
Cream	CR-1	1	1.049	0.004	0.38
	CR-2	0.1	0.101	0.001	0.81

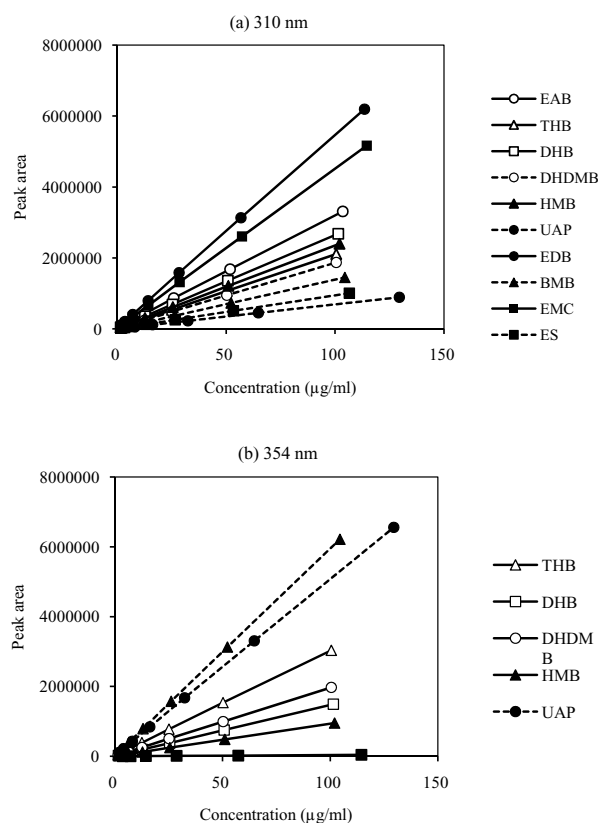
**n = 4-5.

The sample (0.5 g) was dissolved in 20 ml of THF by ultrasonication. After centrifugation, 1 ml of the supernatant was diluted to 10 ml with THF. The sample solution was injected into the HPLC, and the peak area of UAP was measured. The concentration of UAP in the sample solution was derived from the calibration curve, and the amount of UAP in the sample was calculated. The HPLC conditions are described in Fig. 1.

クリーム及び乳液からの回収試験を行った。Fig. 6 には UAP 配合各試料の THF-水移動相を用いたグラジエント条件におけるクロマトグラムを示した。いずれの試料のクロマトグラムでも UAP の後ろに 1 本ピークが出現した。乳液製剤で観察されたピーク (peak 1) の保持時間は EMC の保持時間と一致した。今回 2-シアノ-3,3-ジフェニルプロパ-2-エン酸 2-エチルヘキシルエステルは標準物質を持っておらず、クリーム製剤でのピーク (peak 2) について保持時間による同定はできなかった。しかし、UAP 濃度の異なる CR-1 と CR-2 での UAP に対するこのピーク面積比から考えると、これが 2-シアノ-3,3-ジフェニルプロパ-2-エン酸 2-エチルヘキシルエステルである可能性が高い。UAP 配合クリーム及び乳液を試料として繰り返し試験を行った結果、いずれも満足いく回収率で同様な定量値を示し、本試験法の良好な再現性が確認された (Table 3)。

文 献

- 1) European Commission. Scientific Committee on Consumer Products. Opinion on Benzoic acid, 2-[4-(diethylamino)-2-hydroxybenzoyl]-, hexylester

**Fig. 5** Calibration curves of 10 ultraviolet absorbers

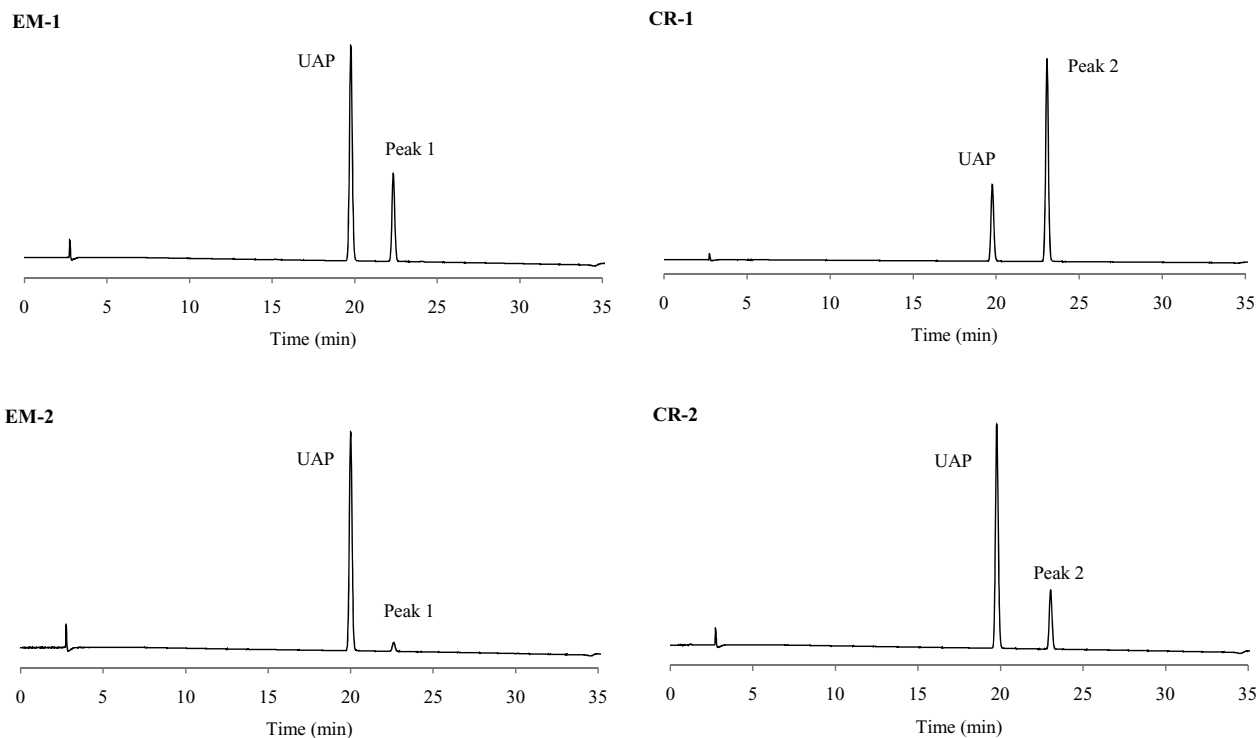


Fig. 6 Typical chromatograms of cosmetics containing UAP

EM-1: milky lotion containing 1% UAP; EM-2: milky lotion containing 0.1% UAP; CR-1: cream containing 1% UAP; CR-2: cream containing 0.1% UAP.

Peak 1 was attributed to EMC. Peak 2 was thought to correspond to 2-cyano-3,3-diphenylpropa-2-en acid, 2-ethylhexyl ester.

The HPLC conditions are described in Fig. 1.

COLIPA no. S83. Adopted by the SCCP during the 8th plenary of 20 June 2006. SCCP/0996/09 http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_059.pdf

- 2) Ministry of Health, Labour and Welfare Notification No.465 of October 2005
- 3) "Method of Analysis in Health Science 2005," eds. By the Pharmaceutical Society of Japan, Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, Japan (2005)
- 4) Ohba, M., Nakamura, K. and Matsuoka, M.: *Yakugaku Zasshi*, **111**, 542-545 (1991)
- 5) Yokoyama, T., Mori, K., Nakamura, Y., Terajima, K., Ohnuki, N. and Ogino, S.: *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **56**, 105-110 (2005)
- 6) Schakel, D.J., Kalsbeek, D. and Boer, K.: *J. Chromatogr. A.*, **1049**, 127-130 (2004)
- 7) Ikarashi, Y., Yamada, M., Uchino, T. and Tokunaga, H.: *Bull. Natl. Inst. Health Sci.*, **125**, 65-71 (2007).