

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いた HPLC による日焼け止め中の紫外線フィルタ成分の測定

著者

Monique Paré Speirs, PhD
Wasatch Product
Development, LLC
427 W 11950 S, Draper, UT,
84020, USA

Limian Zhao
Agilent Technologies, Inc.

概要

日焼け止めは、日焼けや DNA 損傷から皮膚を保護する紫外線 (UV) フィルタリング化合物を用いて製造されています。このアプリケーションノートでは、サンプル前処理後にサンケア製品中の UV フィルタ有効成分を定量分析するための堅牢なメソッドを開発して評価します。有効成分は、HPLC 分析の前に有機抽出とメンブランろ過を行うことにより、日焼け止めローションから抽出しました。標準物質成分のリテンションタイムの再現性は優れていましたが (% RSD \leq 0.11)、カラムに日焼け止めサンプルを連続注入している間に、リテンションタイムの著しいドリフト、ベースラインのシフト、および不規則なピーク形状が観察されました。Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジを用いて抽出サンプルからマトリックス脂質を取り除くことにより、クロマトグラフィーに関する問題を解決しました。7 種類の市販のサンケア製品中に存在するすべての UV フィルタ化合物を連続注入する際のリテンションタイムの一貫性を大幅に改善することにより、許容できるレベルの定量真度と回収率 (95 ~ 103.5 %) を達成しました。

はじめに

化学的なサンケア製品中の有効成分は、UV 範囲でのモル吸光係数が高い FDA 認可済みの芳香族化合物です。これらの UV フィルタリング化合物を保湿剤、乳化剤、および増粘剤と一体化することにより、有効成分が適用可能な安定した製剤を生成し、UV 放射から皮膚を保護します。

市販 (OTC) のサンケア製品が幅広い範囲の保護を実現して米国連邦規則に適合していることを確認するには、定量分析試験が必要です¹。日焼け止め製剤の複雑なマトリックスと有効成分の UV 吸光係数を考慮すると、製品の一貫性と品質を保証するために現在選択できるメソッドは HPLC です。ただし、これらの製品に存在するマトリックス脂質がクロマトグラフィーの再現性を低下させる一因となり、カラムに発生した汚染物質によりメソッドの真度と精度の信頼性も低下してしまいます。このアプリケーションノートでは、Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジを用いたサンケア製品の分析でのクロマトグラフィーの再現性とカラムの寿命を向上させるためのシンプルなサンプル前処理手法について説明します。

実験方法

化学物質および標準試料

HPLC グレードの水、HPLC グレードのイソプロピルアルコール (IPA)、および日焼け止め製剤²で一般的に使用されている 5 種類の FDA 認可済み UV フィルタの USP 標準物質は、Sigma-Aldrich から購入しました (表 1)。各標準物質 10 mg を混合して IPA に溶解し、化合物あたりの最終濃度を 2 mg/mL にすることにより、標準物質混合物の原液を前処理しました。この原液は化合物ごとの最高濃度のキャリブレーションレベル (レベル 5) として使用し、さらに 1 (レベル 4)、0.5 (レベル 3)、0.25 (レベル 2)、および 0.125 mg/mL (レベル 1) の、原液の 4 段階の希釈液を準備して中間のキャリブレーションレベルとして使用しました。

消耗品

サンプル前処理では、次の消耗品を使用しました。

- 15 mL 遠心分離チューブ (Celltreat, p/n 229412)
- Agilent 6 mL Captiva EMR-Lipid カートリッジ (p/n 5190-1004)
- 10 mL NORM-JECT ルアースリップ シリンジ (Henke Sass Wolf, p/n 4100-000V0)
- Agilent アダプタ: 1、3、および 6 mL (p/n 12131001)
- Agilent Premium 0.2 μm ガラスファイバ/ナイロンシリンジフィルタ (p/n 5190-5132)

- Agilent 2 mL 茶色スクリュウキャップ バイアル (p/n 5182-0716)
- Agilent スクリューキャップ、PTFE/赤シリコンセブタム (p/n 5190-7024)

パーソナルケア製品からの UV フィルタ化合物の抽出とクリーンアップ

軽量スケールを使用して 100 mg の日焼け止めまたはリップクリームを計量し、15 mL 遠心分離チューブに直接注入しました。抽出プロセスを開始するために、2 mL の高温水 (85 ~ 95 °C) をチューブに加えてサンプルを十分に振とうし、2 分間ボルテックスしました。10 mL の IPA をチューブに加えてさらに 2 分間ボルテックスし、10 分間超音波処理しました。溶媒和と拡散をさらに促進するために、サンプルを再度同じ方法でボルテックスして超音波処理しました。

表 1. UV フィルタ標準物質の化学的特性

UV フィルタ	構造
名称: オクトクリレン 分子式: C ₂₄ H ₂₇ NO ₂ 分子量 (g/mol): 361.48	
名称: オクチノキサート 分子式: C ₁₈ H ₂₆ O ₃ 分子量 (g/mol): 290.40	
名称: アボベンゾン 分子式: C ₂₀ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol): 310.39	
名称: ホモサレート 分子式: C ₁₆ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol): 262.34	
名称: オクチサレート 分子式: C ₁₅ H ₂₂ O ₃ 分子量 (g/mol): 250.33	

また液相と固相の分離を促進するために、サンプルを 2,500 rpm で 15 分間遠心分離しました。沈殿物を廃棄し、上澄みの約半分を慎重に 6 mL Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジに移しました。カートリッジの上部にアダプタキャップを固定し、10 mL のルアースリップシリンジを使用してサンプルに加圧しました。サンプル混合物を、1 滴あたり 3 ~ 5 秒の流量で低圧にしてカートリッジを通過させました。溶離液を、新しい 15 mL 円錐形遠心分離チューブに採取しました。サンプルの最初の半分が通過した後、残りを EMR カートリッジに移しました。Agilent Premium 0.2 μ m ガラスファイバ/ナイロンシリンジフィルタを通してサンプルを 2 mL 茶色ガラスバイアルに直接フィルタリングすることにより、粒子を取り除きました。

装置条件

分析には、クォータナリポンプ、真空デガッサ、オートサンプラ、カラム熱交換器、およびダイオードアレイ検出器 (DAD) を搭載した Agilent 1260 Infinity II LC システムを用い、Agilent ChemStation ソフトウェア (Rev. C.01.09) によって制御しました。Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 カラム (3.0 \times 50 mm、2.7 μ m) と InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 ガードカラム (2.1 \times 5 mm、2.7 μ m) を用いて、クロマトグラフィー分離を実施しました。注入量は 1 μ L で、注入ごとに IPA によりニードルを 3 回洗浄しました。成分の分離に使用したイソクラティック移動相、流量、およびカラムコンパートメント温度は独自のものです。データ取得では、DAD を波長 238 nm で使用しました。分析ストップタイムは 11 分でした。次の注入の前にカラムを 95 % IPA で洗浄して移動相で再度平衡化するとともに、各サンプルの分析後に注入なしのブランクランを実施しました。

結果と考察

標準物質のシステム適合性

図 1 に示すように、このメソッドにより標準物質混合物において優れたベースライン分離を達成しました。0.78 分に観察された負のピークは注入によるアーティファクトです。1.92 分に観察されたピークは、以前に報告されているアボベンゾン標準の不純物です³。4.92 ~ 9.87 分の間に観察された 6 個の明確なピークは、図に示す溶出順序で同定された標準物質です。

リテンションタイム、ピーク幅 (半値幅)、ピーク対称性、USP テーリングファクタ、および分離度は、標準物質混合物の 6 個の成分のベースライン分離が優れていることを立証しています (表 2)。図 2 は、標準物質混合物の 6 回の繰り返し注入に対するクロマトグラフィーの重ね表示です。このメソッドでは標準物質の 6 個のピークすべてに対して、リテンションタイムは % RSD 0.06 ~ 0.11、ピーク面積は % RSD < 0.41 という優れた再現性を示しました。

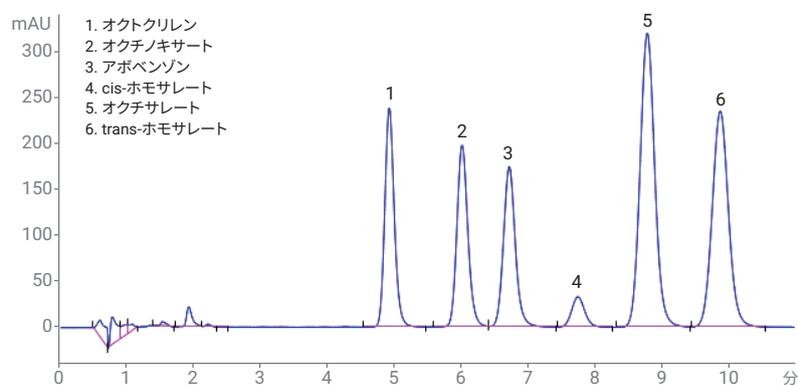


図 1. 標準物質混合物中の UV フィルタ化合物のクロマトグラフィー溶出プロファイル

表 2. 標準物質混合物の注入での 6 種類の成分のリテンションタイム (分)、ピーク幅 (半値幅)、ピーク対称性、USP テーリングファクタ、および分離度

ピーク番号	成分名	リテンションタイム	半値幅	対称性	USP テール	分離度
1	オクトクリレン	4.922	0.150	0.85	1.158	NA
2	オクチノキサート	6.011	0.174	0.85	1.154	3.97
3	アボベンゾン	6.716	0.186	0.90	1.121	2.31
4	cis-ホモサレート	7.742	0.210	0.86	1.105	3.06
5	オクチサレート	8.779	0.234	0.93	1.082	2.76
6	trans-ホモサレート	9.870	0.260	0.94	1.074	2.61

直線性

0.125 ~ 2 mg/mL の標準物質混合物について、対応する濃度とピーク面積の関係をプロットすることにより、各 UV フィルタ化合物の直線性の高い検量線を作成しました。図 3 に、5 個の UV フィルタ化合物の検量線と対応する相関係数 (R^2) を示します。5 個すべての検量線の R^2 値は > 0.999 ですが、これはキャリブレーション範囲内で各標準物質のピーク面積と濃度の間に直線関係が存在することを示しています。

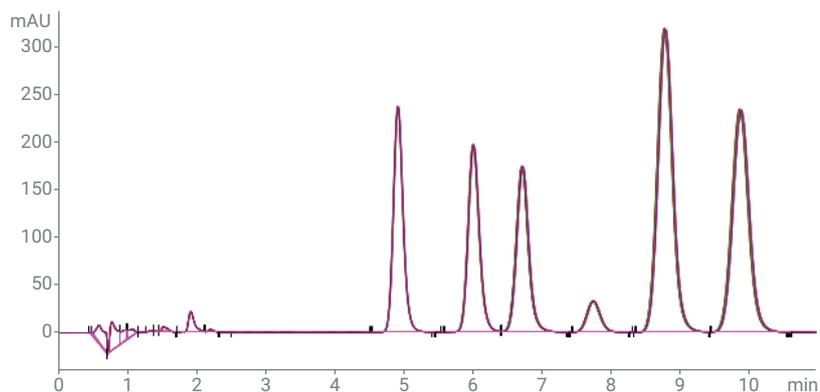


図 2. 標準物質混合物の 6 回の繰り返し注入に対するクロマトグラフィーの重ね表示

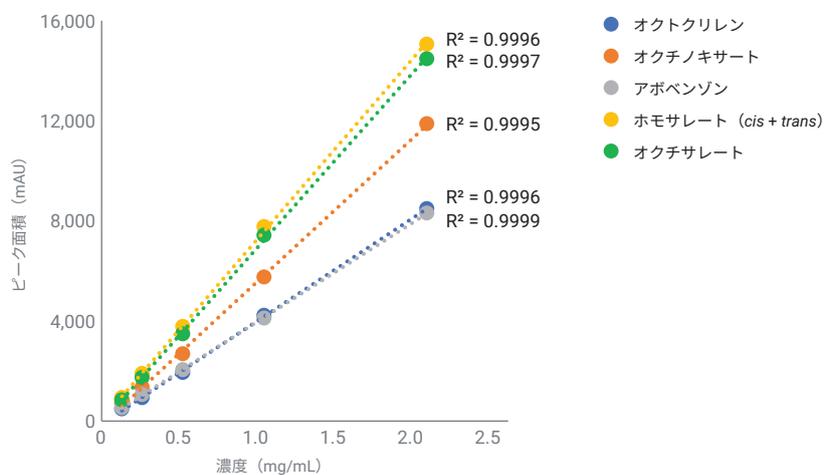


図 3. UV フィルタ標準物質の検量線の直線性と相関係数

Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップなしの OTC サンケア 製品サンプルのクロマトグラフィー

2 種類の市販の OTC 日焼け止めローション（日焼け止め A と B）から有効成分を抽出して、0.45 μm ナイロンメンブレンシリンジフィルタ（Sigma-Aldrich）でろ過し、クリーンアップなしでカラムに注入しました。日焼け止めサンプルを、標準物質混合物とともに図 4 と 5 に重ね表示しています。初めはクリーンアップしていない日焼け止め A 抽出サンプルで、標準物質混合物と同じリテンションタイムで予測される 6 個のピークがすべて検出されました。ただし、システムでクリーンアップしていない日焼け止め A 抽出サンプルでさらに連続注入を実施すると、クロマトグラムに明確なリテンションタイムのドリフトが現れ始めていますが（図 4）、これは注入ごとに高有機溶媒洗浄を実施しているにもかかわらずカラムに汚染物質が累積していることを示唆しています。

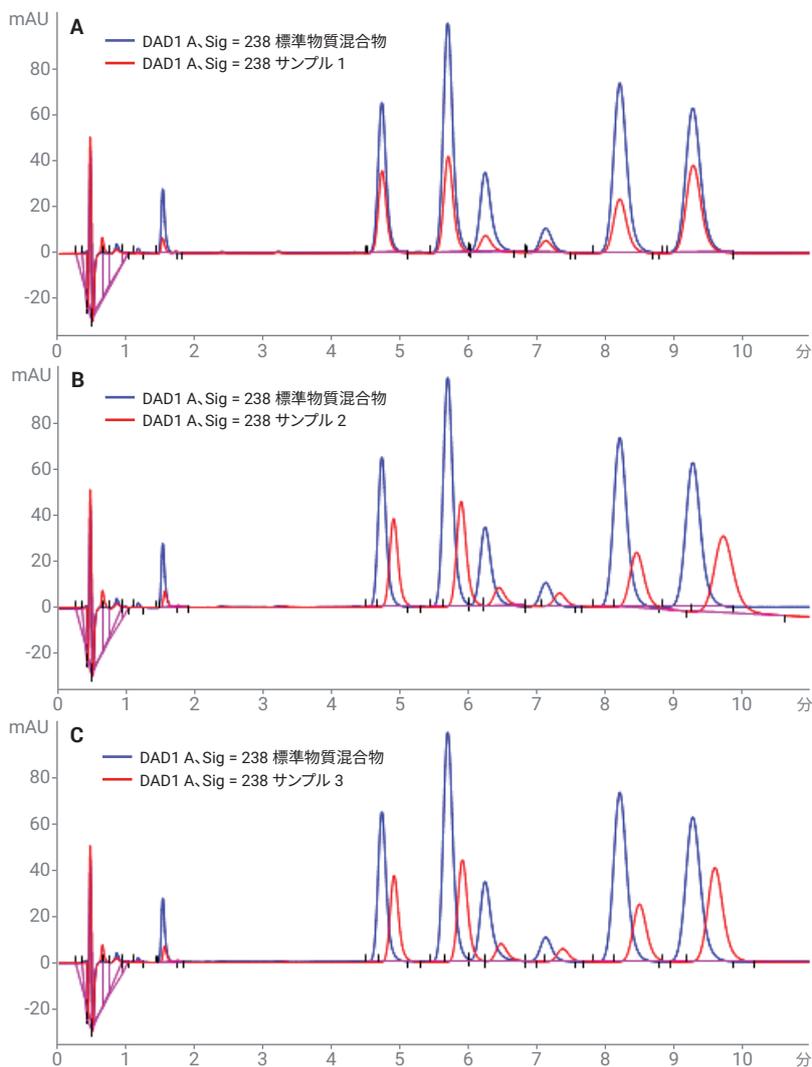


図 4. 3 つの日焼け止め A 抽出サンプルのクリーンアップなしの連続注入と標準物質混合物の重ね表示

日焼け止め A サンプルの直後に注入された、クリーンアップしていない 3 つの日焼け止め B 抽出サンプルでも同じ問題が観察されました (図 5)。ガードカラムを交換して分析カラムをバックフラッシュすることにより当初のリテンションタイムのシフトは多少改善されましたが、不規則なピーク形状やベースラインのシフトなどクロマトグラフィーに関する他の重大な問題は、その後も標準物質混合物を注入することにより顕著になりました (図 6)。わずか 200 回の注入後にカラムは使用できなくなりました。興味深いことに、カラムに注入されたサンプルの大部分 (97%) は純粋な標準物質で、クリーンアップなしで注入されたマトリックスサンプル 6 回だけでカラムが完全に壊れた (図 4 と 5) ことを示しています。

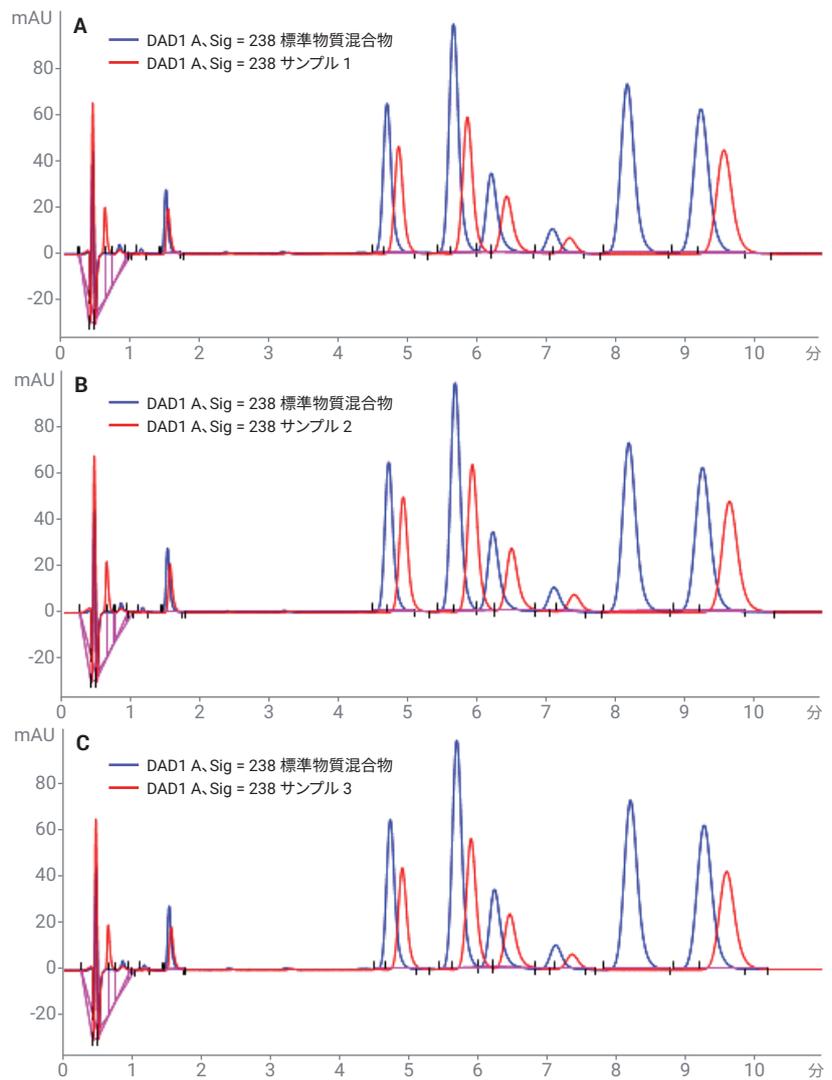


図 5. 3 つの日焼け止め B 抽出サンプルのクリーンアップなしの連続注入と標準物質混合物の重ね表示

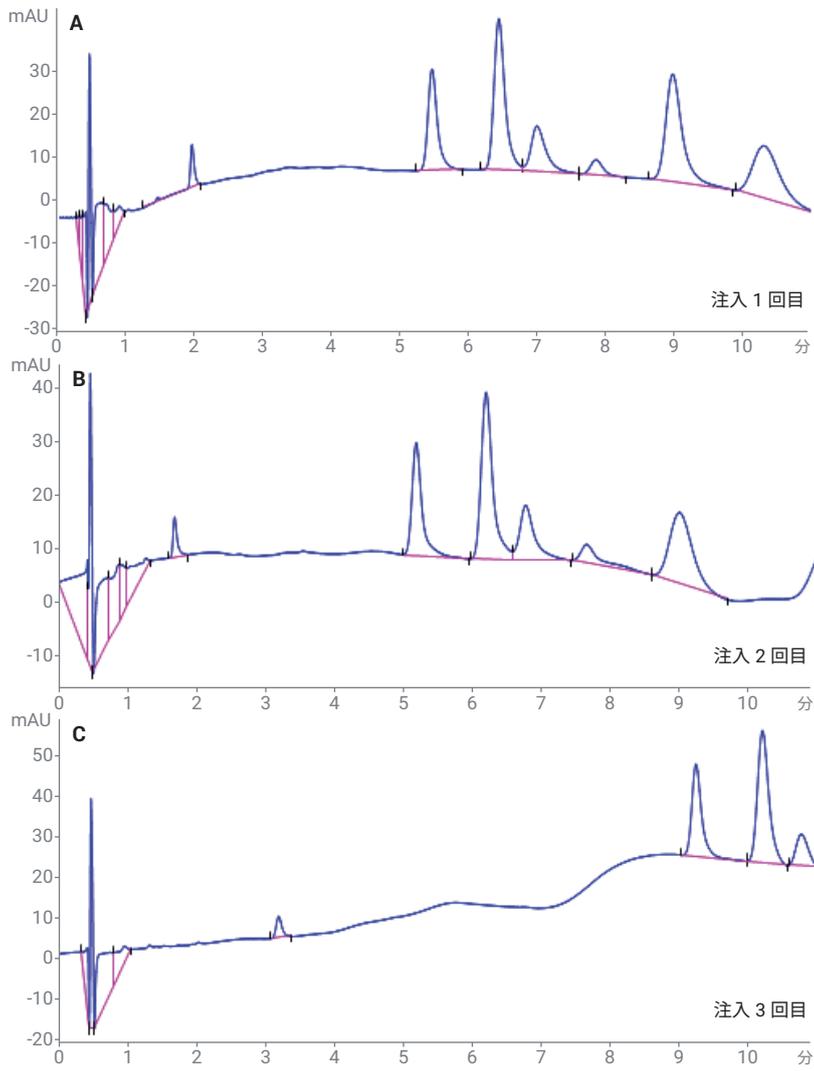


図 6.6 種類の日焼け止めサンプル注入後の標準物質混合物の連続注入

抽出後の Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップによるクロマトグラフィーの改善

複雑なサンプルマトリックスに起因するクロマトグラフィーの大幅な低下を解決するために、サンプルの抽出後に Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを実施しました。6 種類の市販の OTC 日焼け止めローションと 1 種類の OTC リップクリームから有効成分を抽出しました。各製品は、2～5 種類の有効 UV フィルタ化合物を用いて製造されていました。Agilent Captiva EMR-Lipid カートリッジを使用して未精製のサンプル抽出物をクリーンアップし、マトリックス脂質を取り除きました。新しい分析カラムとガードカラムを取り付けて各製品を 3 回抽出し、繰り返し注入により分析しました。図 7 に、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップにより各製品 (A～G) から抽出したサンプルの代表的なクロマトグラムを示します。各 OTC 製剤中に存在する有効成分について、キャリブレーション範囲内の各標準物質と同じリテンションタイムで予測されるピークおよびピーク面積がすべてのサンプルで観察されました。一方、カラムに注入した 7 種類の異なる製品サンプルの 6 回の連続注入の各回において、リテンションタイムのドリフトおよびその他のクロマトグラフィーに関する問題のいずれも観察されませんでした。

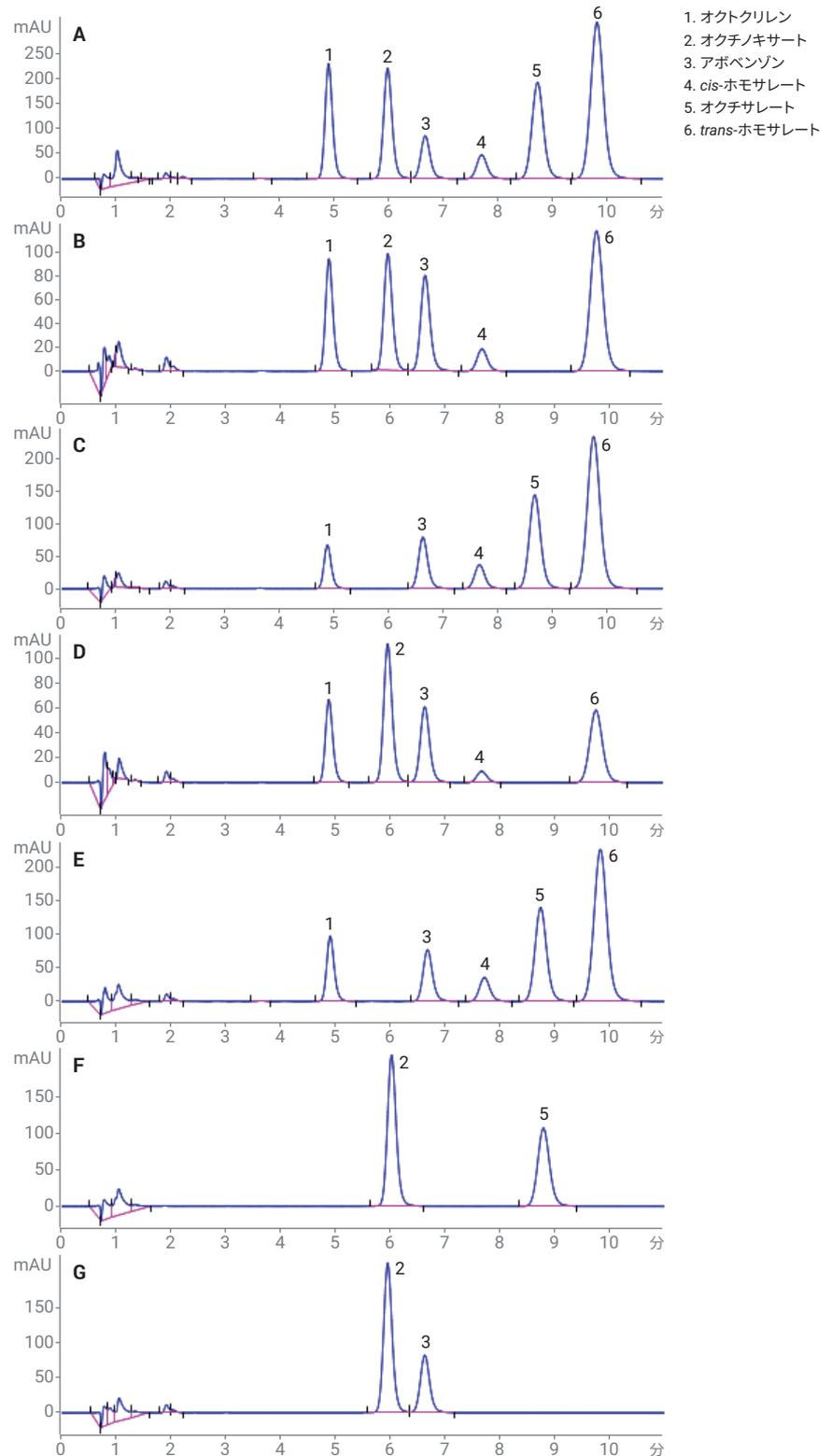


図 7. OTC 日焼け止めローション (A、B、C、D、E、および F) とリップクリーム (G) サンプルの代表的な 6 回のクロマトグラムの重ね表示

表 3 に、OTC サンプル分析の定量結果を示します。42 回のサンプル注入すべてにおける UV フィルタ有効成分の % 回収率は 95.0 ~ 103.5 % の範囲で、回収率の RSD は ≤ 2.19 % でした。7 種類の製品での各 UV フィルタ成分の平均回収率は 95.1 ~ 101.1 % の範囲でした。すべての製品サンプルの繰り返し分析の定量結果は許容できる信頼範囲 (95 ~ 105 % の回収率) 内に収まっており、この分析メソッドは試験対象のすべての製品の真度と回収率の許容基準を満たしています。同じカラムを使用して 150 個の OTC 製品サンプルで 600 回を超える注入を実施し、UV フィルタ回収率が許容できるレベルであることを確認することにより、高品質のクロマトグラフィーを維持しました。

表 3. Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップ (製品ごとに n = 6) 後の 7 種類の異なる OTC 製品サンプルから抽出された UV フィルタ化合物の平均回収率 (%)、標準偏差、および % RSD

日焼け止めローション A	オクトクリレン	オクチノキサート	アボベンゾン	ホモサレート	オクチサレート
平均回収率 (%)	98.67	97.63	100.22	98.92	97.63
標準偏差	2.16	1.94	2.20	2.12	1.97
% RSD	2.18	1.99	2.19	2.15	2.02
日焼け止めローション B	オクトクリレン	オクチノキサート	アボベンゾン	ホモサレート	
平均回収率 (%)	97.25	97.71	99.39	100.46	
標準偏差	1.58	1.47	1.48	1.62	
% RSD	1.63	1.50	1.49	1.62	
日焼け止めローション C	オクトクリレン	アボベンゾン	ホモサレート	オクチサレート	
平均回収率 (%)	98.55	97.5	95.58	100.13	
標準偏差	0.60	0.62	0.58	0.49	
% RSD	0.60	0.64	0.61	0.49	
日焼け止めローション D	オクトクリレン	オクチノキサート	アボベンゾン	ホモサレート	
平均回収率 (%)	99.46	98.76	100.14	101.01	
標準偏差	0.72	1.26	1.35	1.48	
% RSD	0.73	1.28	1.34	1.46	
日焼け止めローション E	オクトクリレン	アボベンゾン	ホモサレート	オクチサレート	
平均回収率 (%)	100.46	100.28	99.04	100.63	
標準偏差	1.52	1.82	1.17	0.95	
% RSD	1.51	1.81	1.19	0.94	
日焼け止めローション F	オクチノキサート	オクチサレート			
平均回収率 (%)	98.18	95.25			
標準偏差	0.26	0.20			
% RSD	0.26	0.21			
リップクリーム	オクチノキサート	アボベンゾン			
平均回収率 (%)	95.68	99.52			
標準偏差	0.70	0.71			
% RSD	0.73	0.72			

結論

このアプリケーションノートでは、日焼け止め製品の分析試験でのクロマトグラフィーに関するマトリックス効果の課題について説明しました。6種類の異なる日焼け止めローションと1種類のリップクリームの未精製抽出物から、UVフィルタリング剤の回収率を低下させずに、Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを用いてマトリックス脂質を選択的に取り除きました。試験対象のすべての製品サンプル中の有効成分に対して、許容できるレベルの定量真度と回収率を達成しました。サンプル前処理プロセスに対して Agilent Captiva EMR-Lipid クリーンアップを実施することにより、複数の日焼け止めとリップクリームサンプルを同じカラムで連続して堅牢に分析することが可能になり、有効な注入の合計回数が > 200 % に増大しました。このメソッドを使用することにより、化粧品の研究、製品開発、および品質管理における OTC 試験の実験の効率、データの再現性、およびコスト効率を向上させることができます。

参考文献

1. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) . Labeling and Effectiveness Testing: Sunscreen Drug Products for Over-The-Counter Human Use—Small Entity Compliance Guide. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/labeling-and-effectiveness-testing-sunscreen-drug-products-over-counter-human-use-small-entity>. Retrieved September 22, **2019**.
2. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration. Sunscreen: How to Help Protect Your Skin from the Sun. <https://www.fda.gov/drugs/understanding-over-counter-medicines/sunscreen-how-help-protect-your-skin-sun#targetText=Sunscreens%20labeled%20%22%20water%20resistant%22%20are,directions%20on%20when%20to%20reapply>. Retrieved September 22, **2019**.
3. Joseph, S.; Woodman, M. Agilent 1290 Infinity LC with Agilent Poroshell Columns for Simultaneous Determination of Eight Organic UV Filters in under Two Minutes. *Agilent Technologies Application Note*, publication number 5990-6861EN, **2010**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

アジレント・テクノロジー株式会社

© Agilent Technologies, Inc. 2019

Printed in Japan, December 11, 2019

5994-1611JAJP

DE.8710648148