

藥物食品檢驗局調查研究年報9:69-77,1991
Ann. Rept. NLFD Taiwan R.O.C. 9:69-77,1991

利用高效液相層析法定量防曬劑中 OXYBENZONE及OCTYL DIMETHYL PABA成分

劉春英 楊明玉 簡俊生 張柏林

第一組

摘要

本研究發展一簡單、精確、快速的逆相高效液相層析法，同時分離及定量防曬劑中Oxybenzone (I) 及Octyl dimethyl PABA (II) 二成分。Eusolex 6300被用作內部標準品，使用之層析管含Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4.6mm I.D. x 15cm 不鋼管)，移動相為Acetonitrile : 水(85 : 15)，測定波長為UV 280nm。系統適用性測試結果，重複注射二成分之c.v. 值不超過0.76% (I) 及0.51% (II)；所得標準曲線之線性關係良好，r值分別為0.9998 (I) 及0.9999 (II) 回收率實驗之分離效果亦佳，實驗結果均在99.6% ~ 100.4% (I) 及100.4% ~ 102.0% (II) 之間。另就不同劑型不同SPF之市售產品8件，應用此法作定量分析，由其層析圖譜顯示，分離效果如預期之理想，各檢體之含量亦皆符合90.0% ~ 110.0% 規定。本法在10分鐘內即可定量完畢，現已成功地應用於本局例行案件之檢驗。

前 言

一般所謂的防曬劑(Sunscreens)亦稱紫外線遮斷劑(Ultraviolet Blocker)，已被綜合性介紹^{1,2,3}，近年來，由於因過度曝曬於太陽光下，而導致皮膚老化。皮膚癌之病歷廣被報導，已引起人們對防曬劑的注意與需求，使防曬劑市場快速成長，使用人口激增，而防曬劑成分之化學構造式。化學性質與其成品處方之配伍亦倍受重視。防曬劑中一般以添加紫外線吸收劑(Ultraviolet Absorbers)為主，依其化學結構式可區分為1. Para aminobenzoate(PABA) 2. Salicylates 3. Cinnamates 4. Benzophe-

none 5. Anthranilate。其中1.2.3. 類屬於UV-B吸收劑，可吸收290-320nm波長之紫外線，4.5. 類屬UV-A吸收劑，可吸收320nm以上波長之紫外線。UV-A為棕化區(Tanning Region)，對皮膚產生慢性傷害(Delayed damage)^{4,5}。UV-B為紅斑區(Erythematous Region)，對皮膚產生直接傷害(Immediate damage)，故防曬劑之處方中經常配合添加UV-A及UV-B吸收劑，以提高其防曬係數SPF(Sun Protection Factor)^{6,7}，而達到完全保護皮膚，預防皮膚癌的效果。

防曬成分之Oxybenzone為UV-A吸收型防曬劑，Octyl Dimethyl PABA為UV-B吸收

藥物食品檢驗局調查研究年報(Ann. Rept. NLF D)

型防曬劑，兩者皆為防曬劑中最常使用者，因其紫外吸光係數高，安定性高，對皮膚較無刺激性，且經美國藥物食品衛生管理局非醫師處方藥物顧問委員會(FDA-OTC panel)評估為category 1級之防曬劑成分。允許使用劑量：前者1.4-8%，後者2-6%，在市售產品中常以適當比例調配使用，以提高產品之SPF值，達到完美的護膚防曬目的。由本局受理之防曬劑查驗登記及抽驗案件顯示以Octyl Dimethyl PABA及Oxybenzone 配合使用為主成分之產品，佔市場銷售量之絕大部分，因此本年度首先選擇此二成分作為研究探討之重點。

截至目前為止，已有文獻報導⁸，利用Reverse-Phase HPLC方法來分離Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA，但其層析圖上之所有波峰均有嚴重之曳尾現象(Tailing)，另以此二成分之UV吸光圖譜觀之，溶於酒精或甲醇溶液中時， λ_{max} 分別在290nm及311nm處，而該研究以UV254nm作為測定波長，顯然並非最佳選擇。此外，義大利之TONELLI, et al⁹。曾經探討多種防晒劑成分之定量，但因分析成分甚多，過程繁瑣複雜費時，且未做回收率及實際檢體含量測定等實驗，對實際檢體檢驗之應用，並無助益。

本研究計劃依此二成分之含量及其偵測感度不同，進行下列之分析研究，尋求一簡單精確迅速之定量法，並同時取不同劑型之市售產品8件，逐一作定量分析，以確定此方法之實際應用性。

材料與方法

一、檢體來源：市售檢體

二、層析條件

1. 高效液相層析儀：

(1) 溶媒輸送系統：Waters 510 HPLC Pump

(2) 逆相層析管：Intertsil ODS-2,5 μ m(4.6mm I.D.x 15cm) GASUKURO KOGYO

(3) UV檢出器：Waters 484 Tunable Absorbance Detector

(4) 積分記錄器：Shimadru C-R6A Chromatopac

2. 實驗分析條件：

(1) 層析管：Inertsil ODS-2,5 μ m (4.6mm I.D. x15cm)

(2) 移動相：Acetonitrile：水 (85：15)

(3) UV檢出波長：280 nm (Attenuation：2x=7)

(4) 流速：1.0ml/min

三、對照標準品及試藥：

(一) 對照標準品：Oxybenzone採SIGMA牌 Octyl Dimethyl PABA採日本太化學社

(二) 內部標準品：3-(4-methylbenzylidene)bornan-2-one(Eusolex 6300)採法國伊伊農藥廠提供原料

(三) Acetonitrile：皓蜂LC級

(四) 藥用酒精：臺灣省菸酒公賣局製造

四、實驗步驟：

(一) 移動相之配製：取Acetonitrile及水，依35：15比例混合，再經0.45 μ m溶媒濾器過濾及超音波浴振盪驅氣後使用。

(二) 內部標準品貯備溶液之配製：取適量之Eusolex 6300精確稱定，以藥用酒精溶解稀釋至約100 μ g/ml

(三) 對照標準品貯備溶液之配製：取適量之Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA對照標準品，精確稱定後以藥用酒精溶解後分別稀釋至約100 μ g/ml及200 μ g/ml

(四) 系統適用性測試：精取5,10,15,20及25ml之對照標準品貯備溶液，各加10ml內部標準品貯備溶液，再以藥用酒精稀釋至100ml，配製成5種不同濃度之標準品溶液，其最終濃度如表一。

表一

	Oxybenzone (μ g/ml)	Octyl Dimethyl PABA (μ g/ml)	Eusolex 6300 (μ g/ml)
Std 1	5.01	10.13	10.01
Std 2	10.02	20.26	10.01
Std 3	15.03	30.39	10.01
Std 4	20.04	40.52	10.01
Std 5	25.05	50.65	10.01

依上述層析條件，分別注射表一各種不同

利用高效液相層析法定量防曬劑中OXYBENZENE
及OCTYL DIMETHYL PABA成分

濃度標準品溶液五次，每次20 μ l，求取Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA波峰高度值與Eusolex 6300波峰高度值，以統計學方法求取高度比之平均值，標準偏差及變異係數等。將各對照標準品之濃度對波峰高度比作圖，求出標準曲線之線性迴歸方程式($Y = mX + b$)及相關係數。

(五)回收率實驗

取防曬劑檢體一件(標示含4% Oxybenzone及8% Octyl Dimethyl PABA)，分別取檢品三份每份約1g，精確稱量依下表，加入精確稱量之Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA對照標準品，充分混合後，配製成Sa1, Sa2, Sa3三種不同含量之測試檢品，如表二。

表二

測試 驗品	已知成分之檢量 (g)	Oxybenzone (mg)	Octyl Dimethyl PABA (mg)
Sa 1	1.0160	40.0	80.2
Sa 2	1.0164	80.4	160.2
Sa 3	1.0166	120.0	240.1

將Sa1, Sa2, Sa3測試檢品，以酒精抽取，稀釋1000倍後，過濾，再分別取濾液10ml，加入內部標準品貯備溶液10ml，再以酒精稀釋至100ml，作為檢測液。

依上述層析條件，分別注射各測液三次，每次20 μ l，求取Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA波峰高度值與Eusolex 6300波峰高度值，以統計學方法求取高度比之平均值，標準偏差及變異係數等。並計算其r值及回收率。

(六)實際檢體含量測定實驗

取市售檢體8件，精確稱定各約1g之檢體量，分別以藥用酒精充分溶解後，過濾，取濾液稀釋至適當濃度，並以Eusolex 6300 10 μ g/ml作為內部標準液之最終測定濃度，各檢體之劑型。處方含量及最終測定濃度如表三。

I : Oxybenzone

II : Octyl Dimethyl PABA依上述層析條件，每次注射各測定液20 μ l，求取Oxybenzone及Octyl dimethyl PABA波峰高度值與Eusolex 6300波峰高度值，並依上述方法計

算其含量。

結果與討論

鑑於Intersil ODS層析管之廣泛使用，且分離效果良好，故選擇此一固定相以分離Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA成分，首先會選擇MEOH : H₂O(800 : 200)加o-Phosphoric Acid 0.5ml作為移動相，但分析結果時間較長，系統較不穩定，最後改以Acetonitrile : H₂O(85 : 15)，結果分析時間縮短，且分離效果良好，故選擇作為移動相溶媒。

取此二成分之標準溶液測定其UV吸收光譜(見圖一)，配合其含量不同，吸光值不同，選擇280nm作為測定波長，可在同一偵測感度之下，同時分離及定量此二成分。

至於本實驗中使用之Eusolex 6300，是否要作為此二成分之內部標準品。由實驗結果顯示，選擇280nm作為含量測定波長時，可配合檢體含量比列舉吸光值而進行本研究，如圖二Eusolex 6300本身為歐洲新開發出之UV-B吸收型防曬劑，但因非FDA-OTC Panel category I級評估為安全有效之防曬劑成分，故不列作本研究之主要分析範圍之內，又由實驗結果發現其波峰與Oxybenzone及Octyl Dimethyl PABA之波峰均無重疊現象，且三種成分之滯留時間：Oxybenzone約3分鐘，Eusolex 6300約5.5分鐘，Octyl dimethyl PABA約9分鐘，知各成分之分離效果良好，且所需之滯留時間不超過10分鐘，而依據本局檢驗實例，含有Eusolex 6300之防曬劑產品，亦可應用本法鑑別定量之，而以Oxybenzone或Octyl Dimethyl PABA作為其內部標準品。

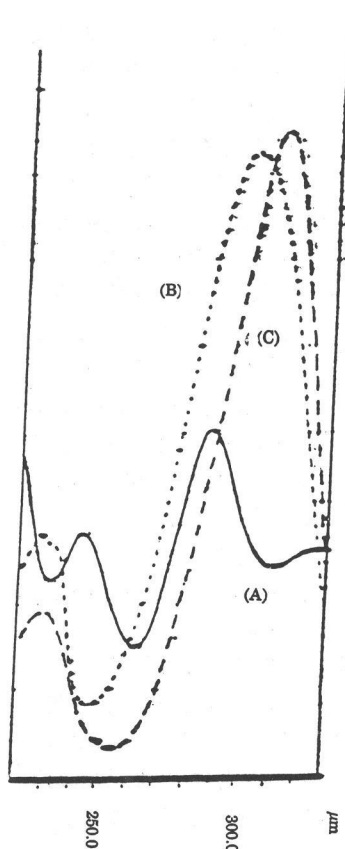
為了探討濃度與波峰之線性關係，取表一之各種不同濃度之標準品溶液，分別注入層析儀，將所得之標準品與內部標準品波峰高度比對濃度作圖。結果均成直線(見圖三及圖四)，顯示二者之線性關係皆良好，相關係數(coefficient of correlation)r值分別為0.9998(I)及0.9999(II)且C.V.值均不超過0.76%(I)及0.51%(II)。

回收率實驗之分離效果亦佳(見圖五)，所得二成分之線性關係皆良好，回收率結果亦良好，

表三

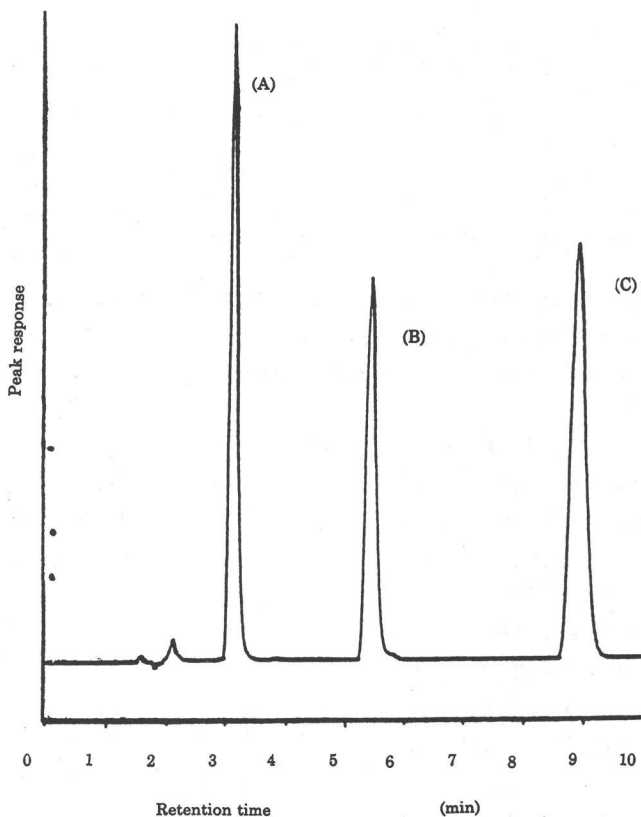
檢體	劑型	標示含量 (mg / g 檢體)		最終測定濃度 (μg / ml)	
		I	II	I	II
檢體 1	霜劑 (SPF35)	40	80	4.81	9.62
檢體 2	乳液 (SPF12)	20	75	11.10	41.60
檢體 3	乳劑 (SPF15)	30	80	16.62	44.33
檢體 4	乳液 (SPF15)	30	60	16.65	33.11
檢體 5	膠劑 (SPF15)	35	70	19.37	38.74
檢體 6	霜劑 (SPF35)	30	80	16.54	44.12
檢體 7	油劑	30	70	16.65	38.85
檢體 8	唇膏劑	0	15	0	15.15

I : Oxybenzone
II : Octyl Dimethyl PABA



圖一：UV吸光圖譜

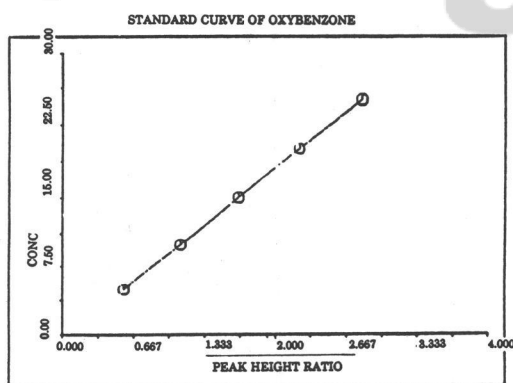
A)—— : Oxybenzone
B)..... : Eusolex 6300
C)----- : Oxyt
Dimethyl PABA



圖二：Liquid chromatogram of a standard solution

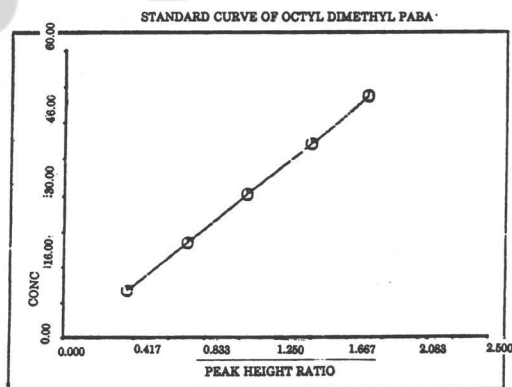
A)Oxybenzone 15.03μg/ml
B)Eusolex 6300 10.0μg/ml
C)Oxyt Dimethyl PABA 30.39μg/ml
Flow Rate : 1.0ml/min
Attenuation : 2^x × = 7

利用高效液相層析法定量防曬劑中OXYBENZENE
及OCTYL DIMETHYL PABA成分



圖三：Oxybenzone 之標準曲線

X	Y
0.5725	5.0100
1.1100	10.0200
1.6489	15.0300
2.2211	20.0400
2.8065	25.0500



圖四：Octyle Dimethyl PABA 之標準曲線

X	Y
0.3759	10.1300
0.7304	20.2600
1.0786	30.3900
1.4490	40.5200
1.7783	50.6500

表四 回收率檢驗結果

	添加劑量 (mg)		實測含量 (mg) *		回收率 (%) *	
	I	II	I	II	I	II
Sa1	40.0	80.2	40.2	80.3	100.4	100.1
Sa2	80.4	160.2	80.1	163.4	99.6	102.0
Sa3	120.0	240.1	120.2	244.7	100.2	101.9

I : Oxybenzone

II : Octyl Dimethyl PABA

* : 取三次結果之平均值

分別為99.6%—100.4% (I) 及100.4—102.0% (II) (見表四)。

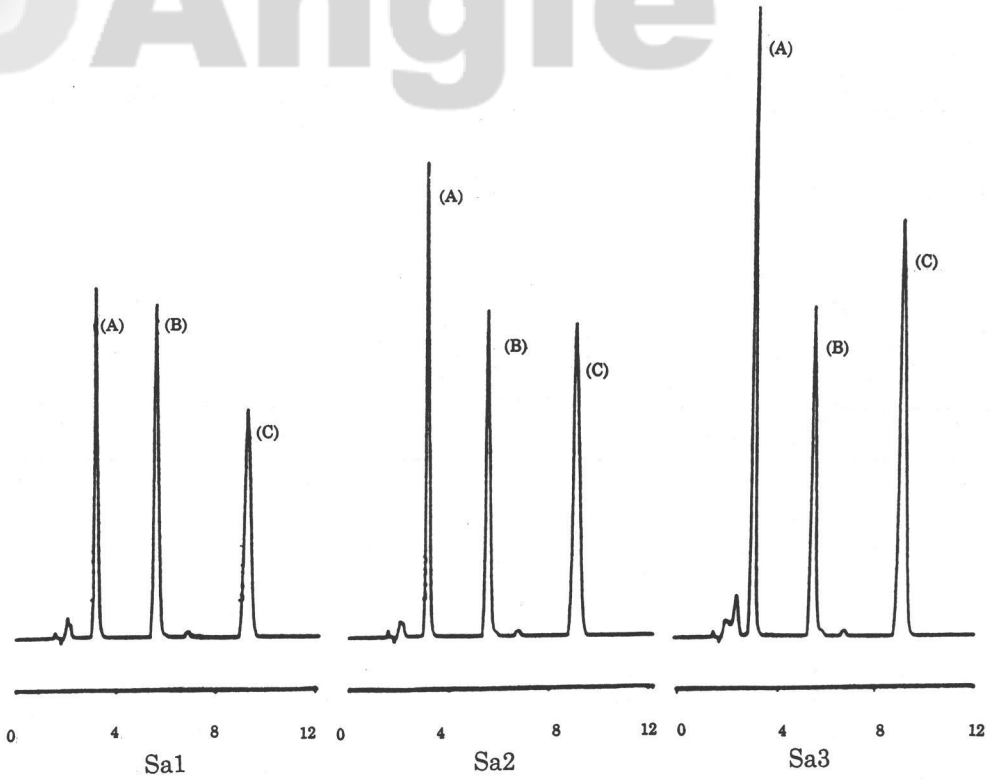
本方法應用於市售產品8件之含量測定方面,由其層析圖譜顯示各成分之分離效果如預期之理想,而未受其他輔助劑之干擾(圖六·七·八·九·十·十一·十二·十三),且各檢體之含量測定結果均符合規定(見表五)。

綜合觀之：本研究之各項設定條件適宜,系統穩定,結果理想,且圓滿完成。

致 謝

本報告之完成,承何智專員鼎力相助,特此致謝。

Angle

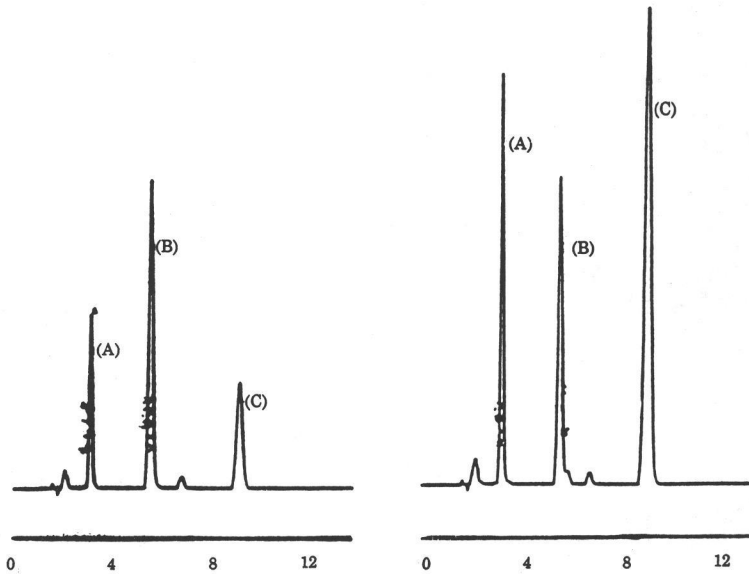


圖五：回收率實驗之液相層析圖

A)Oxybenzone

B)Eusolex 6300

C)Octyl Dimethyl PAPB



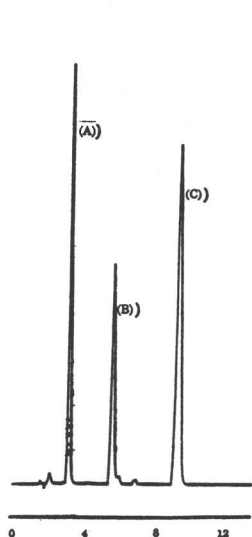
圖六：檢體 1 之液相層析圖

圖七：檢體 2 之液相層析圖

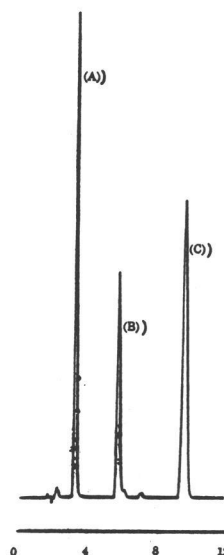
利用高效液相層析法定量防曬劑中OXYBENZONE
及OCTYL DIMETHYL PABA成分

表五 市售產品含量測定結果

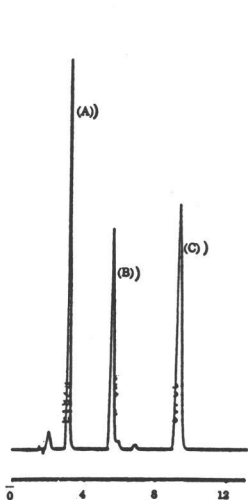
檢體	添加劑量 (mg)		實測含量 (mg) *		回收率 (%) *	
	I	II	I	II	I	II
檢體 1	40	80	43.6	77.3	109.0	96.6
檢體 2	20	75	21.4	77.9	107.0	103.8
檢體 3	30	80	31.1	78.5	103.7	98.1
檢體 4	30	60	28.9	56.9	96.3	94.8
檢體 5	35	70	34.9	69.3	99.7	99.0
檢體 6	30	80	31.7	79.5	105.7	99.4
檢體 7	30	70	29.8	68.2	99.3	97.4
檢體 8	0	15	0	14.8	0	98.7



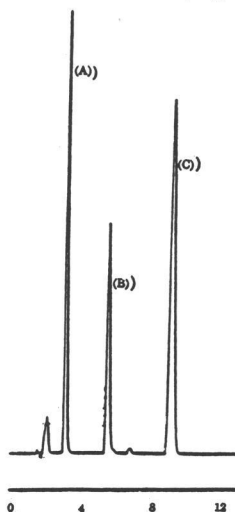
圖八：檢體 3 之液相層析圖



圖十：檢體 5 之液相層析圖

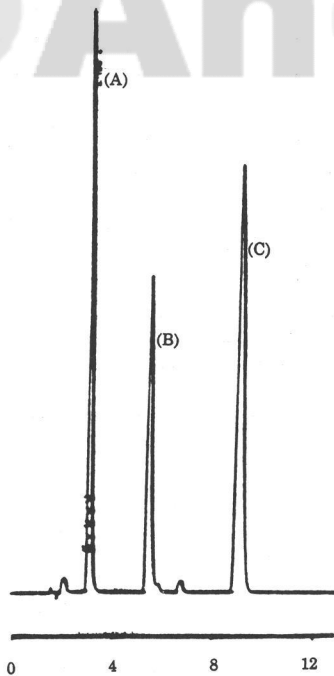


圖九：檢體 4 之液相層析圖

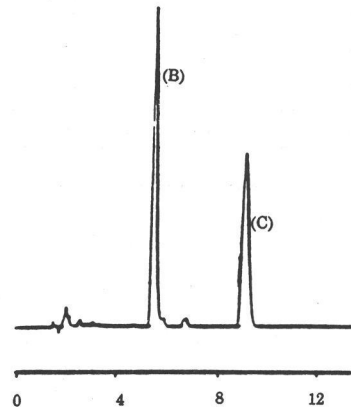


圖十一：檢體 6 之液相層析圖

Angle



圖十二：檢體 7 之液相層析圖



圖十三：檢體 8 之液相層析圖

參考文獻

- 1.a)M. A. Pthank, et al. 1987. Journal of Dermatologic Surgery & Oncology. 13(7) : 739.
- b)G. M. Murphy, J. L. Hawk. 1986. Sunscreens (Reviews). Journal of the Royal Society of Medicine. 79(5) : 254-256.
- c)M. A. Pathak. 1982. Sunscreens : topical and systemic approaches for protection of human skin against harmful effect of solar radiation, journal of the American Academy of Dermatology. 7(3) : 285-312
- 2.Nadim A. shaath. 1986. " The Chemistry of sunscreens". Cosmetic & Toiletries / 55 vol. 101. March.
- 3.a)R. S. Berger. 1989. New Jerser Medicine. 86(5) : 348-350
- b)B. Kessling and H. S. Friedman. 1987. Health Psyonology. 65 : 477-493.
- 4.台北市藥師公會.1989.台北市藥師公會週刊. 7(4) : 34-36.
- 5.吉田他.1987. "標準皮膚科學會第二版" p.88.醫學書院.
- 6.a)R. M. et al. 1980. J. Soc. Cosm. chem. 31 : 133-43.
- b)I. Willis and A. M. Kligman. 1969. J. Soc. cosm. Chem. 20 : 639-51.
- c)J. L. M. Hawk et al. 1982. Clin. Exper. Dermatol. 7:21-31.
- d)L. B. Harrisson, et al. 1982. J. soc. Cosmet. Chem. 33 : 159-262.
7. W. D. Kumler, AM. Perf. 1952. 60 : 427
- 8.Henry S. I. Tan, et al. 1984. Journal of hromatography. 275-282.
- 9.Domenica Tonelli, et al. 1987. Journal of Chromatography. p.408.409-415.

利用高效液相層析法定量防曬劑中OXYBENZONE
及OCTYL DIMETHYL PABA成分



ANALYSIS OF OXYBENZONE AND OCTYL DIMETHYL PABA ON COSMETIC PRODUCTS BY HPLC

CHAN-YING LIEU, MING-YUE YANG, JUNN-SHENG JEAN AND
BER-LIN CHANG

DIVISION OF DRUG CHEMISTRY

ABSTRACT

A simple isocratic, high-performance liquid chromatographic (HPLC) assay proposed for the simultaneous determination of Oxybenzone (I) and Octyl dimethyl PABA (II) in sunscreens, using Eusolex 6300 as an internal standard. Sunscreens samples were extracted by direct dissolution in ethanol. All standards were dissolved by ethanol. The chromatographic conditions included: flow rate = 1.0 ml/min; Inertsil ODS-2 column (5 μ m, 4.6mm I. D. x15 cm); 280nm UV detector. The results

of system suitability tests were as follows: the coefficients of variation were less than 0.76% and 0.51% for (I) and (II) respectively; the correlation coefficients were 0.9998 (I) and (II) respectively; the correlation coefficients were 0.9998 (I) and 0.9999 (II). Recovery experiments gave 99.6% - 100.4% for (I) and 100.1% - 102.0% for (II). The method can be used for the determination of commercial products and has been applied for the routine analysis in our Laboratory.