

利用高效液相層析法同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole等抗菌成分

潘德存 黃守潔 陳玉盆 闕麗卿 施養志

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

本研究係利用高效能液相層析儀建立一簡單、快速的方法能同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及列屬藥品成分管理之Ketoconazole等五種具抗頭皮屑效能之抗菌成分。檢體經由乙腈溶解定容過濾後，以高效能液相層析儀進行分析，層析管柱使用Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (150mm × 4.6mm)，並採用乙腈、甲醇與50 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)作為移動相進行梯度沖提，以光二極體陣列檢出器偵測，檢測波長分別為230、300及340 nm。五種成分標準曲線之線性範圍為5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，線性回歸之判定係數(r^2)介於0.9998-0.9999之間，同日內及異日間試驗之相對標準偏差均 < 2.60%。添加不同濃度之標準品於空白檢體中，回收率介於90.4-112.4%，相對標準偏差均 < 1.3%。最低定量濃度則皆為0.005%。應用本研究所建立之方法檢測市售化粧品10件，結果均符合行政院衛生署公告化粧品中抗菌成分之容許限量，且均未檢出藥品成分Ketoconazole。

關鍵詞：抗菌、抗頭皮屑、高效能液相層析

前言

洗髮精是日常生活中不可或缺的化粧品，無論男女老幼，維持頭髮的乾淨整潔，是相當重要的。惟頭皮屑是常見的惱人問題，常造成社交與人際關係的困擾。一般而言，過度頭皮屑的產生原因，可簡單區分為「病理性」、「生理性」與「微生物」三類。

病理性：有些頭皮屑是疾病引起的，例如「脂漏性皮膚炎」、「乾癬」、「頭癬」等。脂漏性皮膚炎產生的頭皮屑，在秋冬季節會明顯感到頭皮發癢、發紅、脫屑增多、甚至掉髮，主要是因為油脂分泌旺盛區域的皮膚發炎所引起的⁽¹⁾。

生理性：所謂生理性因素，是指不正常的生生活作息，如熬夜、睡眠不足、情緒緊張、壓力過大，或辛辣、油炸等刺激性的飲食都會加重頭皮屑的產生⁽²⁾。

微生物：微生物也是頭皮屑的一大成因。皮膚芽孢菌(*Malassezia furfur*)能夠影響頭皮角質細胞的粘合，並改變皮脂中脂肪酸的比例，是形成脂漏性皮膚炎與頭皮屑的重要因素。根據臨床研究指出，健康正常的頭皮皮脂腺，含有40-50%的皮膚芽孢菌，頭皮屑患者含有70-75%的皮膚芽孢菌，脂漏性皮膚炎患者更高達80%以上，故抑制皮膚芽孢菌過量增生，可改善頭皮屑之問題，Ketoconazole、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Salicylic acid是常添加於洗髮

精中的抗菌成分⁽³⁾。

經查Salicylic acid係屬行政院衛生署公告「化粧品含有醫療或毒劇藥品基準」所載成分，其限量為0.2-2.0%。Zinc pyrithione、Climbazole及Piroctone olamine則屬於化粧品之抗菌成分⁽⁴⁾，其限量分別為1、0.5%(使用後立即沖洗之製品，限量1%)及0.5%。Ketoconazole則是列屬藥品成分管理。文獻有關上述抗菌成分之檢驗，多使用高效液相層析法^(5,6)，惟尚未有同時鑑別並定量五種成分專一性高之分析方法。為提高檢驗效率以保障消費者之健康安全，本研究期建立快速、再現性高之液相層析法，可同時分析、鑑別及定量五種抗菌成分，並應用於例行性化粧品中抗菌劑之檢驗。

材料與方法

一、材料

Salicylic acid ($\geq 99.8\%$)及Ketoconazole ($\geq 99.8\%$)對照用標準品購自美國USP，Climbazole ($\geq 99.6\%$)對照用標準品購自美國Fluka，Zinc pyrithione ($\geq 99.0\%$)對照用標準品購自日本TCI及Piroctone olamine對照用標準品購自美國Aldrich ($\geq 99.0\%$)。不含本篇檢測5種抗菌劑成分之洗髮精購自台灣永詮通股份有限公司。乙腈及甲醇採用液相層析級為試藥特級，乙腈購自美國Sigma-aldrich公司，甲醇購自美國Anaoua chemicals supply公司。濾膜(0.45 μm , Nylon)購自Titan。

二、儀器設備

本實驗使用高效液相層析(2695e, Waters, USA)/光電二極體陣列偵測器(2998, Waters, USA)。

三、實驗方法

(一)分析條件

層析管柱型號為Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18，管徑4.6 mm \times 15 cm，5 μm ；移動相為採用乙腈、甲醇與10 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)進行表一梯度沖提，流速為1.0 mL/min；檢

表一、梯度分析條件

時間(min)	A(%)	B(%)	C(%)
0-5	10	15	75
5-7	10	40	50
7-9	10	40	50
9-10	10	50	40
10-12	10	50	40
12-13	10	55	35
13-17	10	55	35
17-20	10	15	75
20-25	10	15	75

測波長為230 nm及300 nm，注入量為10 μL 。

(二)10 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)溶液配製

稱取磷酸二氫鉀1.36 g，加去離子水溶解使成1000 mL，以磷酸調整pH值至2.5，經濾膜過濾，取濾液。

(三)標準品溶液之配製

1.分別取Salicylic acid、Zinc pyrithione、Ketoconazole、Climbazole及Piroctone olamine對照用標準品10.0 mg，精確稱定，共置於50 mL容量瓶中，以乙腈溶解並定容，做為標準品儲備溶液。

2.標準品溶液由上述之儲備溶液配製，臨用時再以乙腈稀釋。

(四)檢液之配製

取檢體約1 g，精確稱定，置於10 mL容量瓶中，以乙腈溶液溶解並定容至10 mL，置於超音波震盪約30分鐘，冷卻後，以濾膜(0.45 μm)過濾，取濾液供做檢液。

(五)標準曲線之製作

分別取Salicylic acid、Zinc pyrithione、Ketoconazole、Climbazole及Piroctone olamine標準品儲備溶液，以乙腈稀釋成5.0-100.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之系列濃度，注入高效能液相層析分析後，就標準溶液所得波峰之面積，求出標準曲線之線性迴歸方程式及相關係數。

(六)確效試驗

利用高效液相層析法同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole等抗菌成分

1. 精密度(Precision)

於對照標準品之線性範圍內，精確量取上述標準品儲備溶液，以乙腈稀釋，分別配製5種不同濃度之標準品溶液，於同一日內及不同的三日連續注入高效液相層析儀分析，每一濃度各進行三重覆，計算標準偏差(S.D.)及相對標準偏差(R.S.D.)。

2. 準確度(Accuracy)

空白液：添加已知三種標的成分於不含本篇檢測5種抗菌劑成分之洗髮精中，同上所述方法(三)配製成檢體溶液後，注入高效液相層析儀分析，求取回收率並計算準確度。

3. 最低檢測濃度(Limit of Detection)

分別將五種成分標準品溶液，以乙腈稀釋，配製成一系列濃度之溶液，添加於不含本篇檢測5種抗菌劑成分之洗髮精(1g)中，溶解並定容至10 mL，配製成檢體溶液，注入高效液相層析儀分析，通常以波峰面積之雜訊比為3：1時之濃度，作為最低檢測濃度⁽⁷⁾。

4. 最低定量濃度(Limit of Quantity)

分別將五種成分標準品溶液，以乙腈稀釋，配製成一系列濃度之溶液，添加於不含本篇檢測五種抗菌劑成分之洗髮精(1g)中，溶解並定容10 mL，配備成檢體溶液，注入高效液相層析儀分析，通常以波峰面積之雜訊比為10：1時之濃度為最低定量濃度值⁽⁷⁾。

結果與討論

一、溶媒的選擇

五種成分中，由於Zinc pyrithione不溶於水，在乙醇、丙酮中溶解度差，乙腈、氯仿中則有一定的溶解性，在二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide)中溶解度較大⁽⁸⁾。惟二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide)極性很強，在液相層析法中對管柱有一定的損害，所以選擇乙腈作為標準品及檢體配製之溶媒。

二、移動相

參考文獻採用乙腈/10 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)用作移動相，當乙腈/10 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)比例為25：75時，在20分鐘內並未觀察到Piroctone olamine的吸收峰出現，比例為40：60時，20分鐘內則未看到Ketoconazole的吸收峰出現，主要是Ketoconazole與Salicylic Acid之吸收峰重疊在一起，而使用乙腈/10 mM磷酸二氫鉀(pH 2.5)梯度沖提時，20分鐘內均可看到全部吸收峰，惟Ketoconazole及Salicylic acid卻分離不完全。這主要是因為乙腈極性較大，導致波峰重疊。因此，在流動相中加入一定比例的甲醇，降低流動相的極性，添加5%的甲醇後，Ketoconazole及Climbazole還是有些許的分離不完全，在添加10%的甲醇後，5種抗菌劑在20分鐘內都能完全分離。

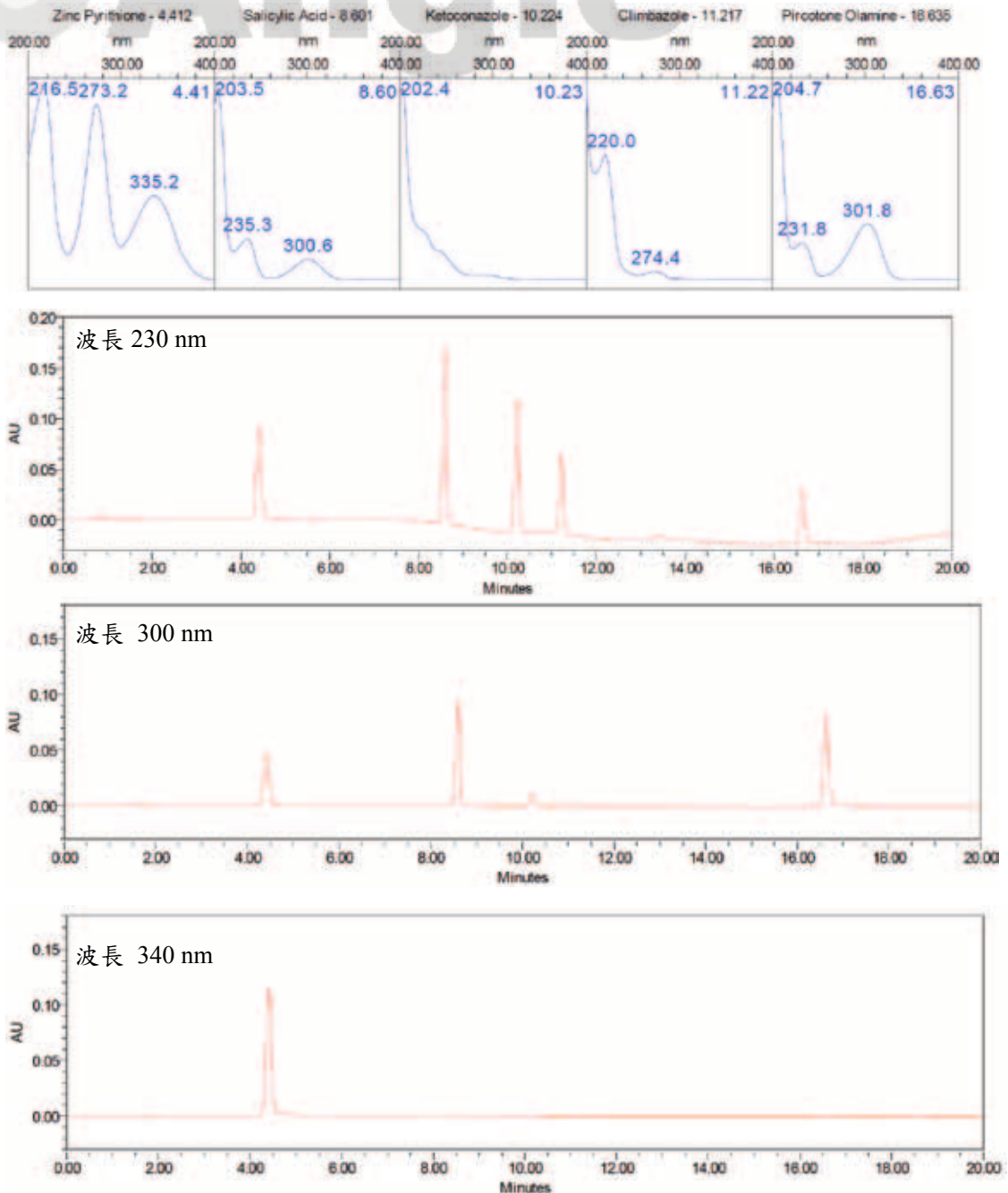
三、檢測波長

不同的化合物有不同的吸收波長(圖一)，這五種抗菌成分選擇最適波長分別為Ketoconazole及Climbazole 230 nm，Salicylic acid及Piroctone olamine選擇300 nm，Zinc pyrithione則為340 nm。

以本方法分析此五種對照用標準品，標準曲線之線性範圍為5-100 $\mu\text{g/mL}$ ，線性回歸之判定係數(r^2)介於0.9997-0.9998之間，呈良好線性關係。分別配製含Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole不同濃度之標準品溶液，於同日內及異日間分析，其結果如表二，同日內及異日間試驗之相對標準偏差，分別介於0.04-2.60%及0.10-1.95%之間，顯示此高效液相層析方法用於此五種成分之再現性良好。表三則為添加此五種成分標準品溶液於空白液洗髮精之回收率，介於90.4-112.4%，相對標準偏差(R.S.D.)範圍介於0.04-1.33%。方法之最低偵測極限(LOD)及最低定量濃度(LOQ)，分別為0.0005%及0.005%。皆低於公告限量，顯示此方法之靈敏度適當。

為了解本計畫所建立的方法對市售化粧品之適用性，取10種不同之市售洗髮精檢體，將檢體經前述方法製備成檢液後，再以所建立之高

Angle



圖一、五種抗菌劑在20 ppm下不同波長的層析圖

效液相層析法，分析其是否含有Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole成分，其中5件均未檢出抗菌劑成

分，4件檢出Zinc pyrithione，均在1%以下，2件檢出Salicylic acid，均在0.2%以下，全部檢體均符合相關規定(表四)。

利用高效液相層析法同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole等抗菌成分

表二、同日間與異日間分析

化合物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	平均 \pm 標準偏差		相對標準偏差(%)	
		同日間*	異日間**	同日間*	異日間**
Zinc pyrithione	5	5.1 \pm 0.06	5.2 \pm 0.02	1.20	0.29
	10	10.1 \pm 0.08	10.1 \pm 0.03	0.70	0.26
	20	19.6 \pm 0.12	19.7 \pm 0.09	0.60	0.46
	50	50.4 \pm 0.14	50.2 \pm 0.19	0.30	0.38
	80	79.6 \pm 0.06	79.5 \pm 0.14	0.10	0.17
	100	100.2 \pm 0.23	100.3 \pm 0.10	0.20	0.10
Salicylic acid	5	5.3 \pm 0.02	5.41 \pm 0.07	0.32	1.34
	10	10.1 \pm 0.04	10.1 \pm 0.09	0.40	0.84
	20	19.5 \pm 0.03	19.4 \pm 0.16	0.15	0.82
	50	50.2 \pm 0.07	50.3 \pm 0.11	0.14	0.21
	80	79.8 \pm 0.17	79.3 \pm 0.49	0.21	0.62
	100	100.2 \pm 0.08	100.5 \pm 0.39	0.07	0.39
Ketoconazole	5	5.0 \pm 0.01	5.1 \pm 0.10	0.09	1.90
	10	10.1 \pm 0.08	10.1 \pm 0.04	0.75	0.37
	20	19.7 \pm 0.01	19.5 \pm 0.25	0.06	1.27
	50	50.6 \pm 0.06	50.5 \pm 0.10	0.12	0.20
	80	79.5 \pm 0.12	79.4 \pm 0.14	0.15	0.18
	100	100.2 \pm 0.07	100.3 \pm 0.15	0.07	0.15
Climbazole	5	4.9 \pm 0.02	4.9 \pm 0.10	0.48	1.95
	10	10.1 \pm 0.06	10.0 \pm 0.02	0.62	0.28
	20	19.8 \pm 0.03	19.8 \pm 0.08	0.16	0.40
	50	50.5 \pm 0.18	50.5 \pm 0.24	0.23	0.47
	80	79.7 \pm 0.18	79.5 \pm 0.23	0.23	0.329
	100	100.0 \pm 0.04	100.2 \pm 0.23	0.04	0.23
Piroctone olamine	5	5.5 \pm 0.14	5.5 \pm 0.09	2.6	1.65
	10	10.2 \pm 0.07	10.1 \pm 0.17	0.67	1.63
	20	19.5 \pm 0.05	19.5 \pm 0.08	0.28	0.42
	50	50.0 \pm 0.38	50.5 \pm 0.14	0.75	0.27
	80	79.4 \pm 0.32	79.2 \pm 0.18	0.40	0.23
	100	100.6 \pm 0.23	100.7 \pm 0.15	0.23	0.15

*同一天重複三次

**每一天重複三次，連續三天

本研究建立之分析方法，能簡單、準確、快速且同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及列屬藥品成分管理之Ketoconazole等五種具抗頭皮屑

效能之抗菌成分。可應用於例行性市售化粧品之檢驗，以確保產品之衛生安全，保障消費者之健康。

表三、回收率

化合物	添加回收濃度	回收率(%)	相對標準偏差
	($\mu\text{g/mL}$)	平均 \pm 標準偏差	(%)*
Zinc pyrithione	5	112.4 \pm 0.01	0.16
	10	90.4 \pm 0.01	0.12
	20	92.5 \pm 0.05	0.26
Salicylic acid	5	98.1 \pm 0.01	0.14
	10	98.3 \pm 0.01	0.04
	20	105.9 \pm 0.01	0.07
Ketoconazole	5	106.7 \pm 0.01	0.25
	10	96.3 \pm 0.01	0.05
	20	93.5 \pm 0.07	0.38
Climbazole	5	98.9 \pm 0.01	0.15
	10	95.8 \pm 0.02	0.25
	20	94.0 \pm 0.05	0.28
Piroctone olamine	5	108.5 \pm 0.03	0.64
	10	98.0 \pm 0.04	0.42
	20	103.6 \pm 0.27	1.33

*n=3

參考文獻

- Hay, R. J. and Graham-Brown, R. A. C. 1997. Dandruff and seborrheic dermatitis: causes and management. Clin. Exp. Dermatology. 22(1): 3-6.
- Nowicki, R. 2006. Modern management of dandruff. Pol. Merkur Lekarski. 20(115): 121-4.
- Johnson, B. A. and Nunley, J. R. 2000. Treatment of seborrheic dermatitis. Am. Fam. Physician. 61(9): 2703-2710.
- 行政院衛生署。2004。化粧品含有醫療或毒劇

表四、市售洗髮精檢體檢驗結果

編號	製造國別	許可證字號	檢驗結果
1	台灣	無	Salicylic acid 0.01%
2	日本	無	未檢出*
3	台灣	無	Zinc pyrithione 0.90 %
4	台灣	無	Zinc pyrithione 0.87 %
5	台灣	無	Zinc pyrithione 0.91 % Salicylic acid 0.08%
6	未標示	無	Zinc pyrithione 0.89 %
7	台灣	無	未檢出*
8	未標示	無	未檢出*
9	未標示	無	未檢出*
10	日本	無	未檢出*

* 未檢出指Salicylic acid、Zinc pyrithione、Ketoconazole、Climbazole及Piroctone olamine等成分均在本分析方法最低檢測極限值0.005%以下

藥品基準。93.10.19衛署藥字第0930335332號公告。

- Chao, L. 2001. Simultaneous determination of four anti-dandruff agents including octopirox in shampoo products by reversed-phase liquid chromatography. Int. J. Cosmet. Sci. 23: 183-188.
- Chen, L. M., Hu, G. S. and Tian, Y. P. 2009. Determination of three kinds of anti-dandruff agents in cosmet. by high performance liquid chromatography. J. Environ. Health 26: 919-920.
- 行政院衛生署。2009。分析方法確效指導手冊。行政院衛生署食品藥物管理局，台北。
- Terry, G. 1972. Clear Zinc Pyrithione Preparation. J. Soc. Cosmet. Chem. 25: 99-114

利用高效液相層析法同時分析化粧品中Salicylic acid、Zinc pyrithione、Climbazole、Piroctone olamine及Ketoconazole等抗菌成分

Simultaneous Determination of Salicylic acid, Zinc pyrithione, Ketoconazole, Climbazole and Piroctone olamine in Cosmetics by HPLC

TE-TSUN PAN, SHOU-CHIEH HUANG, YU-PEN CHEN, LIH-CHING CHIUEH
AND DANIEL YANG-CHIH SHIH

Division of Research and Analysis, FDA

ABSTRACT

A high performance liquid chromatographic method was developed for simultaneous determination of salicylic acid, zinc pyrithione, ketoconazole, climbazole and piroctone olamine in cosmetics, using a Lichrospher Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (I.D 15 cm × 4.6 mm, 5 μm) column. In order to survey the quality of marketed cosmetics, 10 samples were randomly collected by local health personnel in Taiwan area during the year of 2011. A mixture of 50 mM KH₂PO₄, methanol and acetonitrile was used as mobile phase by gradient elution. Flow rate was 1.0 mL/min and the chromatography was monitored by the absorbance at 230, 300 and 340 nm. The correlation coefficients, r^2 , of regression equations of the five calibration curves were 0.9998-0.9999. The relative standard deviations (RSD) of the five estrogen ingredients for intraday and interday analysis were less than 2.60%. The average recoveries of these three ingredients spiked in sample ranged from 90.4 to 112.4%. The RSD's of average recoveries were less than 1.3%. The limits of quantitation in cosmetics were 0.005% for salicylic acid, zinc pyrithione, ketoconazole, climbazole and piroctone olamine.

Key words: zinc pyrithione, antibacteria, salicylic acid, HPLC