

## 親水性相互クロマトグラフィー (HILIC) によるアラントインの分析

宮本紫織 井上 智 小笠原光憲 金本 昭 大瀬戸光明 井上博雄

### Determination of Allantoin by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

Shiori MIYAMOTO, Satoshi INOUE, Mitsunori OGASAWARA,  
Akira KANAMOTO, Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE

Although allantoin is widely used in the products such as drugs, cosmetics etc, the gradual decrease of its content owing to the prescription is reported. Therefore to analyse its quick and reproducible determination method, Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) was applied.

It is difficult to retain allantoin to the ODS column without ion-pair reagent for its low hydrophobicity, but we could retain it by HILIC. In this technique, acetonitrile-water (95:5) simple eluent system was used and excellent peak resolution was achieved depend on preparing the sample with acetonitrile-water (95:5).

The standard concentration curve was linear in the range of 0.5-200 ( $\mu\text{g/ml}$ ) ( $r=1.0000$ ). The recovery in 2 samples (lotion and cream) were more than 94% and both coefficients of variation were 0.6%, respectively.

**Keywords :** Allantoin, HPLC, HILIC

### はじめに

アラントインは抗炎症作用, 抗潰瘍作用, 細胞賦活作用等を有しており正常な皮膚に対しても使用できることから, 医薬品, 医薬部外品, 化粧品等多くの製品に幅広く使用されている。しかし, 製剤処方によってはアラントイン含量が経時的に低下し, pHが6以上では加水分解が起こることが報告されている<sup>1-3)</sup>。その分解生成物はアラントイン酸, グリオキシル酸, アラントインとグリオキシル酸の縮合物であることも報告されている<sup>4)</sup>。

アラントインの高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) による定量法として, イオン交換カラム<sup>2-5)</sup>, ODSカラム<sup>6)</sup> 及びアミノカラム<sup>1)</sup> を用いた方法が報告されている。しかし, アラントインの疎水性が低いため, 一般的に汎用されているODSカラムに保持させるためにはイオンペア試薬を用いる必要があった<sup>6)</sup>。また, アミノカラムやイオン交換カラムはODSに比べて耐久性の面で問題があると思われる。

今回, アラントインの親水性に着目し, HILICカラムを用いたHPLC法を検討した。また, この分析法によりアラントインの安定性に関する実験を行ったので報告する。

### 材料と方法

#### 1. 装置

高速液体クロマトグラフはAlliance 2695 (日本ウォーターズ株式会社) を, フォトダイオードアレイ検出器は2996 PDA (日本ウォーターズ株式会社) を用いた。

#### 2. 測定条件

カラム: Atlantis<sup>TM</sup> HILIC Silica (4.6mm i.d × 150mm, 日本ウォーターズ株式会社)

移動相: アセトニトリル-水 (95:5)

流速: 1.0ml/min

注入量: 10  $\mu\text{l}$

検出波長: 195nm

カラム温度: 40°C

#### 3. 試薬

アラントイン標準品は和光純薬工業株式会社製試薬特級を使用した。

アセトニトリル, メタノールはナカライテスク株式会社製高速液体クロマトグラフ用を, 乳酸, リン酸は和光純薬工業株式会社製試薬特級, クエン酸は吉田製薬株式会社製日本薬局方品を使用した。

標準原液は, アラントイン100もしくは200mgを精密に量り, 水を加えて正確に50mlとした。この標準原液を最終溶媒組成が95%アセトニトリル溶液になるように

アセトニトリルと水を加え調製し、アラントインの標準液とした。

#### 4. 実験試料

回収率検討用試料として、アラントインを配合していない市販のスキンローションとハンドクリームを選択した。

#### 5. 実験操作

試料をローションについては2.5mlを精密に量り、アセトニトリルを加えて正確に50mlとしたものを試料溶液とした。クリームについては2.5g~5.0gを精秤し、水を加えて正確に50mlとする。この溶液2.5mlを精密に量り、アセトニトリルを加えて正確に50mlにしたものを試料溶液とした。

### 結果及び考察

#### 1. HPLC測定条件の検討

##### (1)波長の設定及び移動相の検討

まず、アラントイン標準液について、190~300nmにおける吸収スペクトルを測定した。そのスペクトルパターンを図1に示す。吸収極大は191nmと非常に短い波長であった。

次に、移動相を検討するためにアセトニトリル-水系について、それぞれ混合比を変化させてHPLC法を行い容量比 ( $k'$ ) を求めた。その結果を図2に示す。水の比率を40~5%に減少させることにより $k'$ は0.3から1.3と変化し、アラントインを保持することが確認された。HILICカラムには、少なくとも5%以上極性溶媒を使用することとなっているので、アセトニトリル濃度は最大の95%とした。5%の極性溶媒中にメタノールを添加した場合、 $k'$ はさらに増加し保持されたが、メタノール自体に短波長領域の紫外吸収があり、アラントインの吸収極大付近を測定するにはベースラインが安定しない等の問題が生じたため、メタノールは加えないこととした。また、移動相にギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウムを添加して行ってみたが、これらも低波長領域に吸収があるためバックグラウンドが上がり測定する事が困難であった。これらのことから、移動相にはアセトニトリル-水 (95:5) を用いることとした。

この移動相の条件のもとで3次的に波長を測定した結果、アラントインの吸収極大である191nmではベースラインが安定しなかったが195nmではよいクロマトグラフを得ることができた。このことから、測定波長は195nmとした。

##### (2)試料の調製及び注入量の検討

試料をHPLCに注入する溶媒としては、一般的に移動相と同一あるいは移動相より溶出力の小さな少量の溶媒に溶解するのが望ましいといわれている<sup>7)</sup>。HILICカラムで試料溶媒のアセトニトリル比率を0~97%まで変化

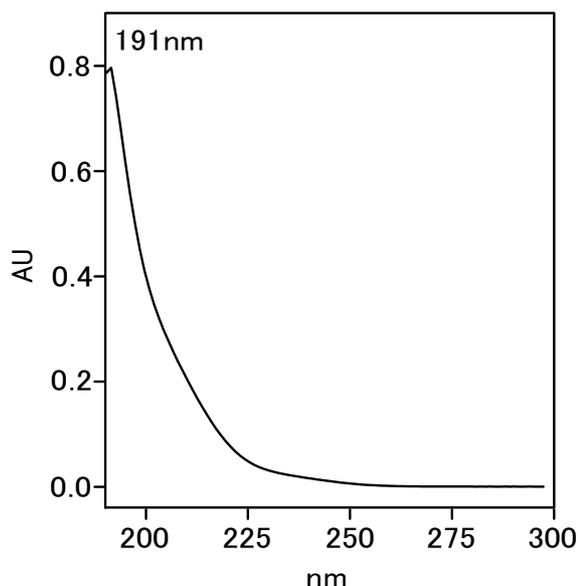


図1 アラントインの吸収スペクトル

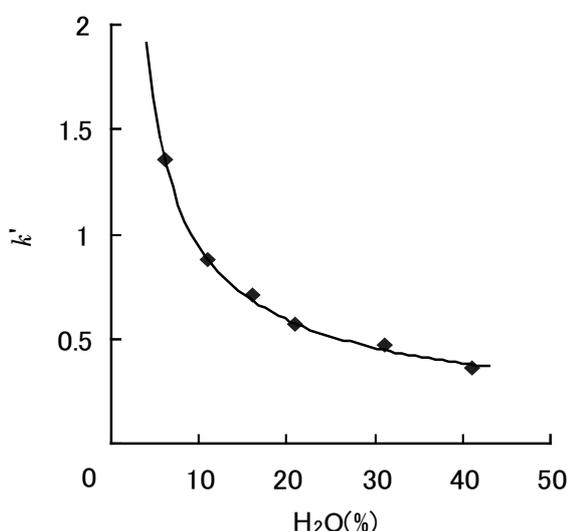


図2 移動相中の水の比率と容量比 ( $k'$ ) の関係 (アラントイン100  $\mu\text{g}/\text{m l}$ )

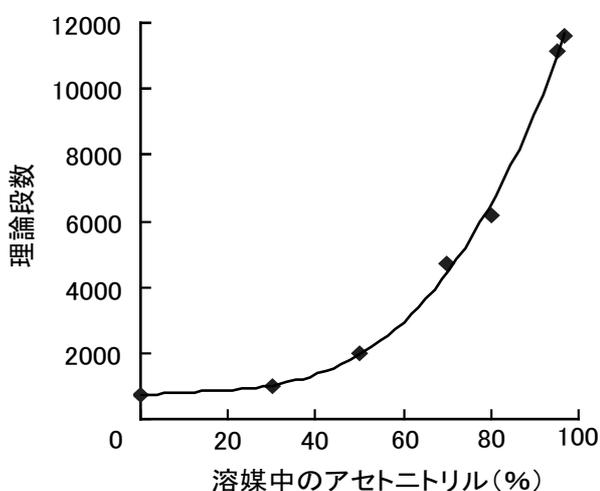


図3 溶媒中のアセトニトリル濃度と理論段数の関係 (アラントイン100  $\mu\text{g}/\text{m l}$ )

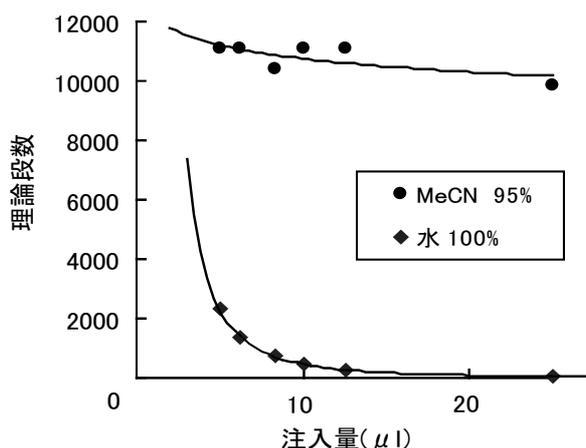


図4 試料注入量と理論段数の関係  
(アラントイン500ng)

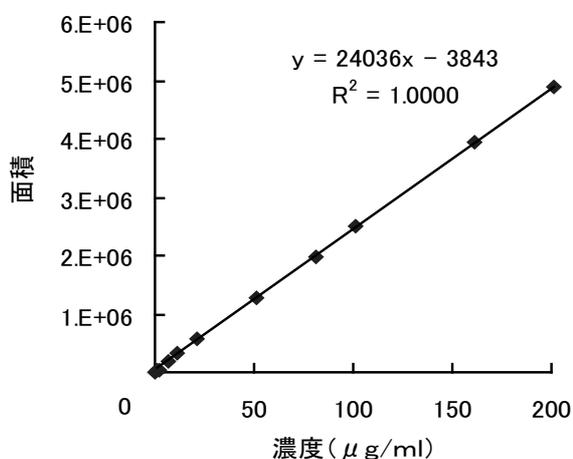


図5 アラントインの検量線

させてアラントインを測定した際の溶媒組成と理論段数の関係を図3に示した。これから分かるように、試料溶媒はアセトニトリル比率が高いほど理論段数が高く優れた分離を示すことが分かった。しかし、アラントインは水には溶けやすいがアセトニトリル等低極性溶媒には非常に溶けにくいという性質がある。そこで、まずアラントインを水に溶解してからアセトニトリルを加えるという方法で溶液を調製する必要があった。この方法により、アセトニトリル比率が95%の溶液を作ることができ、これを試料溶媒とした。

次に、注入量を検討するため、アラントイン注入量が500ngとなるように各濃度を作成した。これらを5~25 $\mu$ l注入した時の理論段数と注入量の関係を図4に示した。理論段数は、水100%の溶媒では注入量が少ないほど高くなったがアセトニトリル95%の溶媒では注入量による大きな変化は見られなかった。そこで、10 $\mu$ lでも定量に問題ない量であると判断し、これを注入量とした。

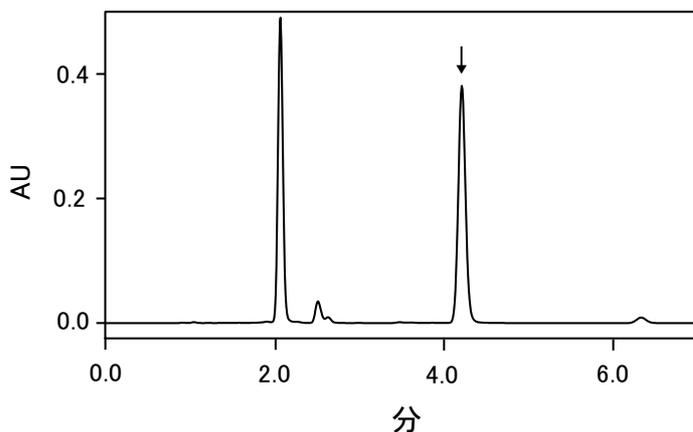


図6 ローション中のアラントインのクロマトグラフ

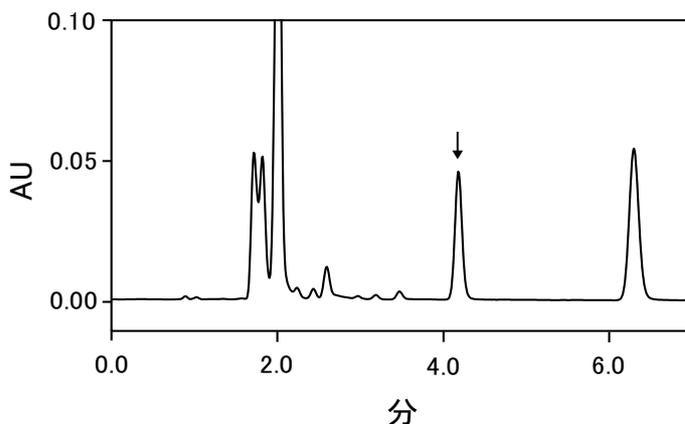


図7 クリーム中のアラントインのクロマトグラフ

表1 添加回収実験結果

添加試料	アラントイン (%)	回収率 (%)
ローション	0.2	94.6 (0.6)
クリーム	0.2	99.6 (0.6)

(n = 6, ( ) 内は変動係数)

### (3)検量線

前述の測定条件で検量線を作成したところ、アラントイン0.5~200 $\mu$ g/mlの範囲で原点を通る直線性を示した。その結果を図5に示した。相関係数は1.0000であった。しかし、アセトニトリル95%溶液では、室温が極端に低いとアラントイン濃度が160 $\mu$ g/ml以上で結晶が徐々に析出することがあったので、検量線の範囲は160 $\mu$ g/mlまでとした。

### 2. 添加回収実験

回収率検討用モデルとして市販の化粧品のスキンローションと医薬部外品のハンドクリームを選択し、アラントイン濃度が0.2%となるように添加して回収率を測定した。その時のクロマトグラフを図6および図7に、

表2 pH調整剤によるアラントインの安定性

pH調整剤	回収率 (%)
乳酸	100.9
リン酸	98.8
クエン酸	99.9
乳酸, リン酸, クエン酸	100.2
リン酸 1 %	100.9

\* アラントイン及び各pH調整剤は、記載のないものについてはそれぞれ0.2%添加

添加回収実験の結果を表1に示した。両者の回収率は94.6%及び99.6%，変動係数は0.6%と大変良好な結果を示した。

### 3. pH調整剤及び熱によるアラントインの安定性

大貫<sup>1)</sup>らによって、アラントインの安定性はpHに依存し、pH6以上になると擬一次反応で分解するということが報告されている。そこで今回、pH調整剤として化粧品等に用いられている乳酸、リン酸、クエン酸の添加で酸性にすることによりアラントインの安定性に影響がどうか実験を行った。アラントイン及びpH調整剤ともに0.2%となるように調製し（リン酸のみ、1%のものも調製）、その回収率を測定した結果を表2に示した。それぞれの回収率は98.8%~100.9%と大変良好な値であり、酸性にするためのpH調整剤からは影響を受けず安定性が保たれた。

次に、製品の流通又は消費者が取り扱う上で起こりうる高温状態でのアラントインの安定性を調べた。夏場の日中、締め切った車中のダッシュボード温度は75℃になるといわれている。そこで、それより高い85℃の熱湯浴槽中に5時間、pH調整剤を添加した上記の溶液を漬け、その回収率を測定した結果を表3に示した。それぞれの回収率は96.7%~103.3%と良好な結果であり、アラントインは酸性状態では熱にも安定であった。

表3 熱によるアラントインの安定性 (85℃, 5時間)

pH調整剤	回収率 (%)
乳酸	101.5
リン酸	101.9
クエン酸	96.7
乳酸, リン酸, クエン酸	101.0
リン酸 1 %	103.3

\* アラントイン及び各pH調整剤は、記載のないものについてはそれぞれ0.2%添加

## まとめ

アラントインをHILICにより分離・定量した結果、次のようなことが明らかとなった。

1. 移動相はアセトニトリル-水 (95:5)、測定波長は195nmとすることにより分離・定量することができた。
2. 理論段数は溶媒組成にアセトニトリルが多く含まれるほど高い値を示した。溶媒は95%アセトニトリル溶液とした。
3. 検量線は0.5~200  $\mu\text{g/ml}$ の間で良好な直線性を示した。検量線の範囲としては、0.5~160  $\mu\text{g/ml}$ が適当であった。
4. スキンローション及びハンドクリームにおける添加回収率は94.6%および99.6%と良好な結果であった。
5. アラントインは、実際に化粧品に使用されているpH調整剤で酸性にすることで安定する。その酸性状態では、熱にも安定である。

## 文 献

- 1) 大貫奈穂美ほか：東京衛研年報, 46, 66-71 (1995)
- 2) 雨宮 敬ほか：東京衛研年報, 44, 94-97 (1993)
- 3) 萩原輝彦ほか：東京衛研年報, 42, 15-20 (1991)
- 4) 山本信也ほか：薬学雑誌, 113 (7), 515-524 (1993)
- 5) 横山俊夫ほか：分析化学, 40, 349-353 (1991)
- 6) 山本隆三ほか：薬学雑誌, 118 (8), 310-316 (1998)
- 7) 社団法人日本分析化学会関東支部：高速液体クロマトグラフィ-ハンドブック (2002)