



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย
เรื่อง

การศึกษาความเสถียรและผลิตภัณฑ์จากการสลายตัว
ของสารกรองรังสียูวี Octyl Methoxycinnamate

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ศุภสร วนิชเวหารุ่งเรือง

รฟ
ธพ 15
011346

ธันวาคม ๒๕๔๔

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ทุนวิจัย

กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การศึกษาความเสถียรและผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารกรองรังสียูวี

Octyl Methoxycinnamate

โดย

ศุภสร วณิชเวชารุ่งเรือง

21 ธันวาคม 2544

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือและร่วมมือของหลายๆคน ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภัทราณี ลิ้มพงศ์ ฐิตินันท์ หมั่นหาผล และ สุดา เกิดโต เป็นอย่างยิ่ง และที่ลืมเสียมิได้ก็คือกองทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ให้เงินทุนสนับสนุนงานนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาเคมี และ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้โอกาสในการทำวิจัยในเรื่องที่ผู้วิจัยสนใจและสนุก



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่	คท คท 15
เลขทะเบียน	011346
วัน,เดือน,ปี	29 ต.ค. 45

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาความเสถียรและผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของสารกรอง
 ริงสียูวี Octyl Methoxycinnamate
 ชื่อผู้วิจัยหลัก สุภศร วนิชเวหารุ่งเรือง
 เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ ธันวาคม 2544

บทคัดย่อ

การศึกษาความเสถียรของ octyl methoxycinnamate (OMC) โดยใช้ C-18 HPLC บ่งชี้ว่า OMC จะ สลายตัวไปเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่เมื่อถูกแสงแดด เมื่อเก็บ OMC ไว้ในที่มืดที่ 4, 20, 32 และ 60°C เป็นเวลา 1 เดือน ไม่พบการสลายตัวของ OMC การทำ online HPLC-APCI-MS ของ OMC และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวให้ APCI mass spectra ที่เหมือนกัน ได้ทำการแยก photo-degradation product โดยวิธี semi-preparative HPLC นำสารที่แยกได้ไปตรวจสอบ NMR spectra ผลการทดลองบ่งชี้ว่ามีการเปลี่ยน configuration จาก octyl-*p*-methoxy-*trans*-cinnamate ไปเป็น octyl-*p*-methoxy-*cis*-cinnamate NMR spectra ของ OMC ที่ตากแดดและยังไม่ผ่านการแยก บ่งชี้ว่า *cis*-OMC เป็นผลิตภัณฑ์เพียงตัวเดียวที่เกิดขึ้น การติดตามการเปลี่ยนคอนฟิгурะชันจาก *trans* ไป *cis* ของ OMC ที่ถูกแสงแดดด้วย C-18 HPLC พบว่าสมมูลภายใต้แสงแดดระหว่าง *trans* และ *cis* ถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของ OMC และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ นอกจากนี้อัตราเร็วในการเปลี่ยนคอนฟิгурะชันก็ถูกควบคุมด้วยปัจจัยทั้งสองเช่นกัน *cis*-OMC ที่เกิดขึ้นมีความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวีที่ลดลง

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product.

Name of the Investigator Supason Wanichweacharungruang (Pattanaargson)

Year 2001

Abstract

A stability study of octyl methoxycinnamate (OMC) using C-18 HPLC indicated that OMC degraded into a new product when exposed to sunlight. When kept in the dark at 4, 20, 32 and 60°C for one month, no degradation of OMC was detected. Online HPLC-APCI-MS revealed similar APCI mass spectra for OMC and its degradation product. Isolation of the photo-degradation product was done using semi-preparative HPLC. NMR spectra of OMC and the isolated photo-degradation product indicated the change from an octyl-*p*-methoxy-*trans*-cinnamate into an octyl-*p*-methoxy-*cis*-cinnamate. NMR spectra of the unfractionated-light-exposed-OMC confirmed that the *cis*-OMC was the only product generated. Upon exposure to sunlight, *trans* to *cis* configurational change of OMC was monitored using C-18 HPLC. It was found that the photostationary equilibrium between *trans*- and *cis*-OMC was affected not only by the concentrations of OMC but also the types of solvent used. The rate of this configurational change also depends on OMC concentrations and the types of solvent used. It was found that the occurred *cis*-OMC possesses reduced UV absorption capability.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
1 บทนำ	1
ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแสงแดดและผลของแสงแดดต่อผิวหนัง	1
สารที่ใช้ป้องกันแสงแดด (Sunscreen Agent) ในเครื่องสำอาง	3
วัตถุประสงค์ของโครงการ	5
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเอกสารอ้างอิง	5
2 วิธีดำเนินการวิจัย	7
2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์	7
2.2 สารเคมี	7
2.3 การเตรียมสารละลาย	8
2.4 ศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่อุณหภูมิของสารละลายที่แตกต่างกัน	8
2.5 ศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่สภาวะถูกแสงกับไม่ถูกแสง	9
2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารที่ได้จากการสลายตัว ของ OMC ออกจาก OMC ด้วยคอลัมน์ semipreparative (C-18)	9
2.7 การแยก OMC ออกจากผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC ด้วย semipreparative HPLC	9
2.8 การหาโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC	10
2.9 ศึกษาผลกระทบจากชนิดของตัวทำละลายในแง่ของควมมีขั้วของ ตัวทำละลายและความเข้มข้นของตัวทำละลาย	10
2.10 ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการ สลายตัวของสาร OMC	11
3 ผลการทดลองและวิจารณ์	12
การวิเคราะห์ OMC และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC ด้วย HPLC	12
ผลจากการศึกษาการสลายตัวของสารมาตรฐาน OMC ที่อุณหภูมิของ สารละลายต่าง ๆ กัน	12
ผลการศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่สภาวะถูกแสง และไม่ถูกแสง	13

การชี้เฉพาะสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ OMC เมื่อถูกแสงแดด	13
การทำ HPLC-APCI-MS ของสารละลาย OMC ที่ผ่านการตากแดด	14
การศึกษาผลกระทบจากชนิดของตัวทำละลายต่อการสลายตัวของ OMC	15
การศึกษาผลกระทบจากความเข้มข้นของ OMC ต่อการสลายตัวของ OMC	15
การศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ OMC	15
4 สรุปผลการทดลอง	16
เอกสารอ้างอิง	35



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

	หน้า
ตารางที่ 1 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสารมาตรฐาน OMC	17
ตารางที่ 2 แสดง resonance ของ ^{13}C NMR ของสารมาตรฐาน OMC	18
ตารางที่ 3 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก OMC	19
ตารางที่ 4 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสาร OMC ที่ผ่านการ ตากแดดแต่ไม่ได้แยก	20
ตารางที่ 5 แสดง resonance ของ ^{13}C NMR ของสาร OMC ที่ผ่านการ ตากแดดแต่ไม่ได้แยก	21

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการภาพประกอบ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสาร OMC	6
รูปที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน OMC ที่ความเข้มข้น 1000 ppm	22
รูปที่ 3a แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 4°C	22
รูปที่ 3b แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 25°C	22
รูปที่ 3c แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 32°C	23
รูปที่ 3d แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 60°C	23
รูปที่ 4 แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสภาวะที่ถูกแสงและไม่ถูกแสง	24
รูปที่ 5 a แสดง ¹ H NMR ของ สารมาตรฐาน OMC	25
รูปที่ 5 b แสดง ¹³ C NMR ของ สารมาตรฐาน OMC	25
รูปที่ 5 c แสดง HMQC NMR ของ สารมาตรฐาน OMC	26
รูปที่ 6 a แสดง ¹ H NMR ของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column	26
รูปที่ 6 b แสดง ¹³ C NMR ของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column	27
รูปที่ 7 a แสดง ¹ H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่มาจากการสลายตัวของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column	27
รูปที่ 8 a แสดง ¹ H NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก	28
รูปที่ 8 b แสดง ¹³ C NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก	29
รูปที่ 8 c แสดง HMQC NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก	29
รูปที่ 9 a แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของ OMC	30
รูปที่ 9 b แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของ สารผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC	30
รูปที่ 9 c แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของเฟสเคลื่อนที่	31
รูปที่ 10 การเปลี่ยน configuration ของ E-OMC ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในตัวทำละลายต่างๆ เมื่อนำสารละลายไปตากแดด	32

รูปที่ 11 แสดง IR Spectra ของ *trans*-OMC และ *cis*-OMC

33

รูปที่ 12 แสดง UV-visible spectra ของ *trans*-OMC และ *cis*-OMC

34



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



1 บทนำ

เป็นที่ทราบกันดีว่าแสงแดดมีทั้งประโยชน์และโทษต่อผิวหนังของมนุษย์ แสงแดดช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างสีผิว ซึ่งก็คือการที่เซลล์ผิวหนังสร้างเม็ดสีหรือเมลานินนั่นเอง แสงแดดเป็นตัวการสำคัญในการกระตุ้นการสร้างวิตามินดีที่ผิว อย่างไรก็ตาม เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปในปัจจุบันว่าแสงแดด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงอัลตราไวโอเล็ตสามารถชักจูงให้เกิดความผิดปกติของผิวหนังได้ อาทิ ผิวแก่ก่อนวัย การเกิดอาการแดดเผา การแพ้แสง และมะเร็งที่ผิวหนังอีกด้วย นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเล็ตยังเป็นตัวการในการช่วยเร่งให้เกิดขบวนการ photochemical ต่างๆ อันนำไปสู่ความเสี่ยงของวัสดุหรือ ผลิตภัณฑ์ทั้งหลาย อาทิ การซีดจางของสีผ้า การกรอบเปราะของแผ่นพลาสติก เป็นต้น

จากความเข้าใจในอันตรายของรังสียูวีทำให้ความนิยมผสมสารกันแดดลงในผลิตภัณฑ์ต่างๆหลายชนิดเพื่อผลในการลดอันตรายจากแสงแดดเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการนำสารกันแดดมาใช้กันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น มีการใช้สารกันแดดเป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์นอมน้ำมัน ใยผ้า และผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับเส้นผม เพื่อปกป้องสิ่งเหล่านั้นหรือปกป้องสิ่งที่ได้รับการเคลือบจากการใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าว จากการทำลายของแสงแดด

สารกันแดด (sunscreen) หรือสารกรองรังสียูวี (UV-filter) จะช่วยลดความเข้มของรังสียูวีที่ผ่านไปยังผิวหนังให้น้อยลง โดยสารกรองรังสียูวีนี้จะทำหน้าที่ดูดกลืนแสงหรือทำให้เกิดการสะท้อนของแสงออกไป

ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับแสงแดดและผลของแสงแดดต่อผิวหนัง

แสงแดดเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าชนิดหนึ่ง คลื่นแสงที่สามารถทะลุลงมาถึงพื้นผิวโลกจะมีช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 290 nm ขึ้นไป ซึ่งแบ่งเป็น ช่วงคลื่นของรังสียูวี (290 - 400 nm) ช่วงคลื่นของแสงที่มองเห็น (400 - 760 nm) และช่วงคลื่นของแสงอินฟราเรด (IR) (0.74 - 1000 μ m)

รังสียูวีเป็นรังสีที่มีอันตรายต่อผิวหนังที่สุด ชนิดของรังสียูวีสามารถแบ่งออกตามช่วงคลื่น ได้ 3 ช่วงคลื่น ดังนี้คือ

1. **UVA** ความยาวคลื่น อยู่ในช่วง 320 - 400 nm สามารถ กระตุ้นให้ผิวสร้าง เม็ดสีหรือเมลานินขึ้นได้ ทำให้ผิวสีเข้มขึ้นทันที (immediate tanning)

2. UVB ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 290-320 nm ทำให้เกิดอาการแฉะผา ผลของ UVB ทำให้ ผิวหนังมีสีเข้มขึ้นอย่างช้าๆ (delayed tanning) รังสีช่วงนี้ทำให้ผิวหนังแก่ขึ้น และก่อให้เกิด มะเร็งที่ผิวหนังได้

3. UVC ความยาวคลื่นอยู่ในช่วง 200 - 290 nm ไม่พบบนพื้นโลก เพราะถูกกรองไว้โดย ก๊าซโอโซนในบรรยากาศในชั้นสตราโทสเฟียร์ (15 - 35 ก.ม. จากพื้นโลก) บางครั้ง UVC นี้ อาจ เรียกว่า germicidal radiation เพราะมันมีพลังงานสูงมากพอที่จะฆ่าเซลล์ให้ตายได้

เมื่อรังสียูวีตกกระทบบนผิวหนัง จะมีปฏิกิริยาดังนี้

- การสะท้อน (reflection) กลับสู่บรรยากาศที่ชั้นบนสุด stratum corneum, epidermis และชั้น dermis ของผิวหนัง ตามปกติแล้ว UVB บางส่วนจะถูกสะท้อนกลับที่ชั้น stratum corneum และชั้น epidermis ส่วน UVA บางส่วนจะถูกสะท้อนกลับที่ชั้น stratum corneum ชั้น epidermis และชั้น dermis
- การดูดซับ (absorption) รังสีโดยชั้น epidermis และชั้น dermis โดยรังสี UVC จะถูกดูดซับที่ชั้น epidermis เท่านั้น ส่วน UVA และ UVB จะถูกดูดซับทั้งที่ชั้น epidermis และชั้น dermis
- การกระจาย (scattering) รังสีบางส่วนที่ทะลุทะลวงถึงชั้น epidermis อาจจะกระจายสู่ชั้น dermis ได้บางส่วน

เมื่อคลื่นแสงถูกดูดซับโดยผิวหนังแล้ว ก็จะมีการเปลี่ยนแปลงสีผิว (tanning) เกิดขึ้น 3 ระดับ ดังนี้คือ

- Immediate Tanning : เป็นการเปลี่ยนสีผิวที่เกิดขึ้นทันทีภายหลังจากที่ได้รับแสงแดด 1-3 ชั่วโมง มักจะเกิดกับแสงแดดในช่วงความยาวคลื่น 300 nm และ 660 nm และที่มีผลเร็วที่สุดคือ ความยาวคลื่น 340-360 nm
- Delayed Tanning : เป็นการเปลี่ยนสีผิวที่เกิดขึ้นจากการออกซิเดชันของเม็ดสีเมลานิน ที่ปรากฏ อยู่ในผิวหนังชั้น basal cell และทำให้มีการเคลื่อนย้ายไปที่ผิวชั้นนอก ซึ่งอาจเกิดขึ้นภายใน 1-10 ชั่วโมง หลังจากที่สัมผัสแสงแดด หลังจากนั้นจะค่อยๆ หายไปภายใน 100-200 ชั่วโมง แสงแดดที่มีผลเช่นนี้คือ แสงแดดในช่วงความยาวคลื่น 295 nm และ 320 nm
- True Tanning : เกิดขึ้นหลังจากการสัมผัสแสงแดดเป็นเวลา 2 วัน และจะเป็นมากขึ้นในอีก 2-3 สัปดาห์ ถัดไป

โดยทั่วไปการป้องกันแสงแดดให้กับผิวหนัง_สามารถทำได้โดยกลไก 2 แบบ คือ

- 1) ป้องกันโดยการสะท้อน (protection by reflection) โดยการใส่สารกันแดดที่เป็นตัวสะท้อนแสงป้องกันไม่ให้รังสียูวี ผ่านมาถึงผิวหนัง สารกันแดดที่ทำหน้าที่นี้ เช่น zinc oxide, titanium dioxide, magnesium carbonate และ magnesium oxide เป็นต้น
- 2) ป้องกันโดยการดูดซับ (protection by absorption) โดยโมเลกุลสารกรองรังสี จะดูดกลืนแสงยูวีเข้าไป พลังงานที่ถูกดูดเข้าไปนี้จะไปทำให้อิเล็กตรอนในโมเลกุลของสารกรองแสงเกิดการเคลื่อนย้ายตำแหน่ง (electronic shift) และสารกรองแสงจะขึ้นไปอยู่ในสภาวะกระตุ้น (excited state) สารในสภาวะกระตุ้นนี้ จะไม่เสถียรและจะค่อยๆคายพลังงานที่ดูดกลืนออกมาเพื่อกลับเป็นสารที่มีระดับพลังงานปกติ (ground state) พลังงานที่คายออกมาช้าๆ มักอยู่ในรูปของพลังงานที่มีความยาวคลื่นยาวกว่าเดิม ซึ่งมักอยู่ในช่วงรังสีที่มองเห็นด้วยตา (VR) หรือรังสีอินฟราเรด (IR) ซึ่งเป็นอันตรายต่อผิวหนังน้อยกว่ารังสี UV การคายพลังงานในช่วงรังสีอินฟราเรด (IR) หรือคายเป็นรังสีความร้อนนั้นมักเป็นกลไกของสารกรองรังสียูวีทั้งหลายที่นิยมใช้ในสินค้าอุปโภคต่างๆ

สารที่ใช้ป้องกันแสงแดด (Sunscreen Agent) ในเครื่องสำอาง

สารป้องกันแสงแดดที่เป็นที่นิยมใช้ในเครื่องสำอางจะเป็นสารที่ดูดกลืนแสงในช่วงที่ทำให้เกิดการไหม้แดดต่อผิวหนัง นั่นคือมีช่วงการดูดกลืนตั้งแต่ 280 - 315 nm ซึ่งก็คือช่วงของ UVB นั่นเอง ดังนั้นสารที่มีสมบัติที่กล่าวมานี้จึงถูกเรียกว่า UVB filter อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้เริ่มมีการตระหนักถึงอันตรายของ UVA เพิ่มขึ้นและก็มีการใช้สารที่ดูดกลืนแสงในช่วง 320-400 nm (UVA filter) อย่างแพร่หลายมากขึ้น

สารดูดกลืนแสงยูวีที่ใช้กันมานาน คือ quinine sulfate, esculin และ tannic acid โดยในอดีตสารเหล่านี้สามารถสกัดได้จากธรรมชาติ ในปัจจุบันสารป้องกันแสงแดดที่นิยมใช้กันเป็นสารสังเคราะห์ พวก aromatic compound ได้แก่

1. กลุ่มอนุพันธ์ของ p-aminobenzoates ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่
 - PABA (p-aminobenzoic acid)
 - Escalol 106 (glyceryl-mono-p-aminobenzoate)
 - Padimate-A (pentyl-p-dimethyl aminobenzoate)
 - Padimate-O (2-ethylhexyl-p-dimethylaminobenzoate)
2. กลุ่มอนุพันธ์ของ anthranilates (O-aminobenzoates) ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่
 - methyl anthranilate

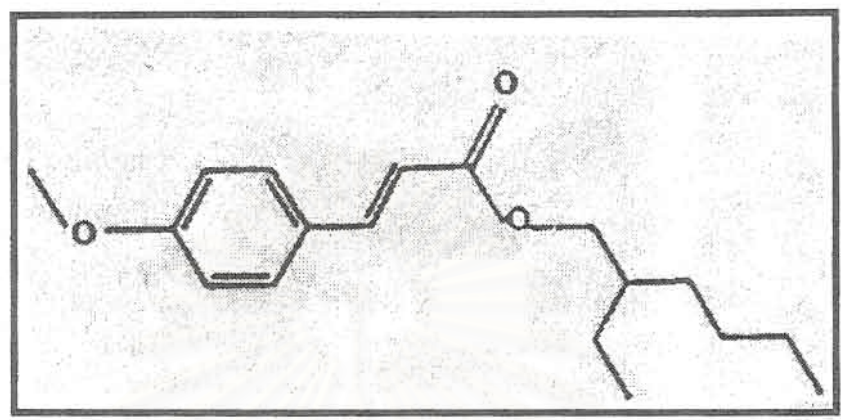
3. กลุ่มอนุพันธ์ของ salicylates ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่
 - benzyl salicylate
 - homosalate (homomethyl salicylate)
4. กลุ่มอนุพันธ์ของ benzophenones ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ oxybenzone (2-hydroxy-4-methoxybenzophenone)
5. กลุ่มอนุพันธ์ของ cinnamates ตัวอย่างสารในกลุ่มนี้ได้แก่ 2-ethyl hexyl-p-methoxycinnamate (Paesol MCX)

UVB filter ตัวหนึ่งที่นิยมใช้กันมากในกลุ่มผลิตภัณฑ์ดูแลส่วนบุคคล (personal care) ในประเทศไทย ยุโรป และอเมริกาก็คือ octyl methoxycinnamate ซึ่งมีโครงสร้างดังรูปที่ 1- สารนี้มีชื่อเรียกได้ต่างๆ อาทิ 2-ethylhexyl-4-methoxycinnamate หรือ Parsol MCX หรือ Eusolex 2292 ซึ่งในที่นี้จะใช้ชื่อย่อว่า OMC ทางสหภาพยุโรป (EU) มีการควบคุมความเข้มข้นในการใช้ OMC ในเครื่องสำอางให้อยู่ที่ 10%

งานวิจัยเกี่ยวกับ photosensitivity หรือ การแพ้ของผิวหนังต่อสารนี้มีรายงานอยู่บ้าง โดยทั่วไปในการใช้สารกรองรังสียูวีในสูตรของเครื่องสำอางจะทำการเติมสารให้ไ้ระดับการป้องกันแสงตามที่ต้องการ โดยนิยมรายงานเป็นค่า SPF หรือ Sun Protection Factor ความเข้มข้นของสารกรองรังสียูวีที่ต้องใช้ในสูตรจึงแปรไปโดยตรงกับค่า extinction coefficient* ของการดูดกลืนแสงของสารนั้น สาร OMC มีสเปกตรัมการดูดกลืนแสงในช่วง UVB ด้วยค่า extinction coefficient ที่ดีพอสมควร ทางที่ดีที่สุดในการใช้สารกรองรังสียูวียอมอยู่ในลักษณะที่ให้ได้การปกป้องที่ต้องการด้วยความเข้มข้นต่ำที่สุด เพื่อลดโอกาสการเกิด irritation และ sensitization กับผิว ซึ่งมีความสำคัญมากเมื่อมีการเพิ่มการใช้ sunscreen ในเด็ก นอกจากนี้ยังเป็นการลดต้นทุนด้วย อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่แสดงการลดลงของประสิทธิภาพการดูดกลืนแสงยูวีของ OMC หลังจากโดนแสงแดด ข้อมูลนี้ประกอบกับผลการทดลองที่ผู้ขอทุนเคยทำการทดลองไปบ้างแล้วซึ่งพบว่าการลดลงของสาร OMC และมีการเกิดขึ้นของสารใหม่เมื่อ OMC ถูกแสงแดด จึงทำให้คาดว่า การลดลงของประสิทธิภาพการดูดกลืนแสงยูวีของ OMC นี้ น่าจะขึ้นกับสมบัติของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นว่ายังสามารถทำตัวเป็นสารกรองรังสียูวีหรือไม่และมีประสิทธิภาพลดลงเพียงใด และขึ้นกับพฤติกรรมของปฏิกิริยาการสลายตัวด้วยว่าจะเกิดมากน้อยเพียงใด และมีการผันกลับได้หรือไม่อย่างไร เมื่อทราบถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของ OMC แล้ว ก็จะสามารถหาวิธีการเลี่ยงหรือ

* บ่งให้ทราบว่าสารนั้นๆมีความสามารถในการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่สนใจมากน้อยแค่ไหน

ลดการเกิดกระบวนการดังกล่าวได้ และยังสามารถนำมาประมวลหาสารที่จะช่วยชลอหรือยับยั้ง
กระบวนการดังกล่าวได้



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสาร OMC

วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 1) เพื่อศึกษาความเสถียรของสารกรองรังสียูวี OMC ที่สภาวะ การถูกแสงแดดและไม่ถูก
และที่อุณหภูมิต่างๆ และศึกษาผลกระทบจากชนิดของตัวทำละลาย
- 2) เพื่อชี้เฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของสาร OMC
- 3) ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของสาร OMC

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และเอกสารอ้างอิง

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าแสงแดดโดยเฉพาะอย่างยิ่งแสงในช่วงอัลตราไวโอเล็ตเป็นปัจจัย
หนึ่งที่ทำให้เกิดมะเร็งในผิวหนัง (1-3) การใช้ผลิตภัณฑ์ประเภท sunscreen หรือ สารกัน
แดด ก็เป็นที่แพร่หลายมากขึ้นทั่วโลก ในประเทศไทยเรานั้นปัจจุบันมีการใช้สารกรองรังสียูวีกัน
อย่างแพร่หลายมาก ซึ่งนอกจากเพื่อวัตถุประสงค์ในการป้องกันมะเร็งผิวหนังแล้ว ยังมีวัตถุประสงค์
อื่นๆเพิ่มเติมจากการใช้สารกันแดด กล่าวคือ มีการใช้เพื่อป้องกันการรับแสงแดดของผิว
อันจะก่อให้เกิดการสร้างเม็ดสีหรือเพื่อความขาวขึ้นของผิวนั่นเอง และผลพลอยได้ข้างเคียงคือลด
การแก่ก่อนวัยอันเนื่องมาจากการที่ผิวหนังถูกแสงแดดทำลาย

ในประเทศไทย สารกรองรังสียูวีที่นิยมใช้มากที่สุดตัวหนึ่งในเครื่องสำอางสำหรับผิว เส้นผม
รวมไปถึงน้ำยาซักผ้า และ น้ำยาปรับผ้านุ่ม ได้แก่ octyl methoxycinnamate หรือ OMC โดยสารตัว

นี้ทางสหภาพยุโรปมีการควบคุมความเข้มข้นในการใช้ให้มีความเข้มข้นสูงสุดได้ 10% อย่างไรก็ตามมีรายงานถึงการเกิด photosensitization และ/หรือ photoallergic ที่ผิวหนังเมื่อใช้สารนี้ (4,5) การตรวจวิเคราะห์เชิงคุณภาพและเชิงปริมาณของสารนี้สามารถทำได้โดยวิธี reverse phase HPLC (6-8) ได้มีรายงานว่าความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวีของสาร OMC จะลดลงเมื่อทิ้งให้ถูกแสง กล่าวคือค่า absorbance ของสาร OMC จะลดลงหากสารนี้ถูกแสงยูวี (9) ผู้วิจัยได้ลองทำการทดลองและพบว่าเมื่อทิ้งสาร OMC ไว้กลางแดดแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC จะพบพีคใหม่ขึ้นมา จึงคาดว่าสารนี้อาจเป็นต้นเหตุของการที่สาร OMC มีการดูดกลืนแสงยูวีที่ลดลงก็ได้ และน่าจะเกิดจากการสลายตัวของ OMC จึงมีโครงการที่จะหาทางซึ่งเฉพาะสารนี้ รวมไปถึงศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นนี้ นอกจากนี้ปัจจัยและกลไกที่ส่งผลให้ค่า absorbance ของสาร OMC ลดลงเมื่อสารนี้ถูกแสงยูวียังไม่มีผู้ศึกษา การทราบปัจจัยดังกล่าวจะช่วยเอื้อต่อการวิจัยหาทางลดหรือยับยั้งการเกิดกระบวนการสลายตัวของ OMC ได้ ซึ่งจะส่งผลให้สามารถใช้สารนี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพยาวนานขึ้นภายใต้แสงแดด และน่าจะช่วยลดภาวะการเสี่ยงต่อการเกิด photoallergic ต่อสารที่มาจากสลายตัวของมันด้วย ยิ่งไปกว่านี้ ความรู้ความเข้าใจต่อกระบวนการหรือกลไกที่ส่งผลให้การดูดกลืนแสงยูวีของสารนี้ลดลงเมื่อถูกแสงแดด ก็จะเป็นแนวทางหรือแบบอย่างในการทำความเข้าใจพฤติกรรมของสารกรองรังสียูวีอื่นๆขณะถูกใช้งานภายใต้แสงแดดได้ด้วยซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาสารกรองรังสียูวีที่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

- เครื่อง HPLC ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ คือ

- Waters TM 600s Controller (Waters Corp., Milford, USA)
- Waters TM 626 Pump (Waters Corp., Milford, USA)
- Waters 486 MS Tunable Absorbance Detector (Waters Corp., Milford, USA)
- Column reverse phase
 - Dimension : 125×4.0 mm
 - Pack material : Nucleosil 100C-18 5 μm (VDS optilap, Berlin, Germany)
- Column semipreparative
 - Dimension : 125×8.0 mm
 - Pack material : Lichrosorb RP18 5 μm (VDS optilap, Berlin, Germany)

- pH Meter รุ่น 744 ของ Metrohm Ion analysis, Metrohm Ltd. CH-1901 Switzerland

- Microsyringe

- ชุดกรอง Knotes Ultra-wareTM และ กระดาษกรอง Millipore FH 0.5 μm และ 0.45 μm (Millipore corporation, Bedford, USA)

- Rotary Evaporator

- เครื่องแก้วต่าง ๆ

2.2 สารเคมี

- สารมาตรฐาน

- Octyl methoxycinnamate (Ethyl hexyl-*p*-methoxycinnamate, Parsol MCX) ได้รับความ
เชื้อเพลิงจาก บริษัท Merck Co. (Bangkok, Thailand)

- ตัวทำละลาย (Solvent)

- Methanol HPLC grade (Lab-scan Analysis Sciences, Bangkok, Thailand)
- Sodium hydroxide AR grade (J.T. Baker Inc., Phillipsberge, NJ, USA)

- Disodium phosphate และ Citric acid AR grade (Fluka Chemic AG, Buchs, Switzerland)

- Helium gas : High purity (Thai Industrial Gas Public Co., Ltd.)

2.3 การเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน octyl methoxycinnamate (OMC) 1000 ppm ใน methanol

ซึ่งสารมาตรฐาน octyl methoxycinnamate จำนวน 0.1 กรัม ละลายใน methanol แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL ในขวดวัดปริมาตรด้วย methanol จะได้สารละลายมาตรฐาน octyl methoxycinnamate 1,000 ppm

2.4 ศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่อุณหภูมิของสารละลายที่แตกต่างกัน

นำสารละลายมาตรฐาน OMC ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดปริมาตร 10 mL จำนวน 3 ขวด ปรับปริมาตรจนครบด้วย methanol ท่อด้วยฟอยล์ รอบ ๆ ขวดสารนำไปเก็บที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

- ขวดที่ 1 ท่อด้วยฟอยล์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น 4°C
- ขวดที่ 2 ท่อด้วยฟอยล์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องปรับอากาศ 20-25°C
- ขวดที่ 3 ท่อด้วยฟอยล์ นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง 32°C

นำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทุก ๆ วันในช่วง 5 วันแรก หลังจากนั้นฉีดวันเว้นวันจนครบ 1 เดือน สภาวะการวิเคราะห์ ดังนี้

- ชนิดของ Column : Nucleosil 100c-18 5 μ m 125 \times 4.0 mm
- Mobile phase : methanol
- Detection : 325 nm
- Temperature : 20 °C
- อัตราการไหล 0.5 mL / min
- ปริมาณที่ฉีด 25 μ L

นำสารละลายมาตรฐาน OMC (ที่ยังไม่ผ่านการเจือจาง) มาใส่ในขวดรูปแหร้นำมาท่อด้วยฟอยล์

- ให้ความร้อนที่ 60 °C โดยใช้ oil bath

- นำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทุกๆวันในช่วง 5 วันแรก และหลังจากนั้นวันเว้นวันจนครบ 1 เดือน โดยใช้สภาวะเช่นเดียวกับข้างบน

2.5 ศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่สภาวะถูกแสงกับไม่ถูกแสง

- ปิเปิดสารละลายมาตรฐาน OMC ที่ความเข้มข้น 1000 ppm ปริมาตร 0.1 mL ลงในขวดวัดปริมาตรชนิด 10 mL จำนวน 2 ขวด ปรับปริมาตรด้วย methanol

ขวดที่ 1 นำมาห่อด้วยฟอยล์เก็บไว้ในที่มืด

ขวดที่ 2 นำไปตากแดด

นำมาฉีดเข้าเครื่อง HPLC ทุก ๆ วันในช่วง 5 วันแรก และหลังจากนั้นวันเว้นวันจนครบ 1 เดือน

2.6 การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับแยกสารที่ได้จากการสลายตัวของ OMC ออกจาก OMC ด้วยคอลัมน์ semipreparative (C-18)

สภาวะที่ใช้วิเคราะห์ ดังนี้

- ชนิดของ Column : Lichrosorb RP 18 5 μ m 125 \times 8.0 mm

- Detection : 325 nm

- Temperature : 20 $^{\circ}$ C

- Flow rate 0.5 mL / min

โดยแปรค่าของ mobile phase เป็นดังนี้ คือ

mobile phase เป็น methanol : H₂O 100 : 0 (v/v)

mobile phase เป็น methanol : H₂O 90 : 10 (v/v)

mobile phase เป็น methanol : H₂O 80 : 20 (v/v)

โดยแต่ละครั้งที่เปลี่ยนชนิดของ mobile phase ให้ equilibrate column เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนการวิเคราะห์

ฉีดสารมาตรฐาน OMC ความเข้มข้น 1,000 ppm ที่ผ่านการตากแดด เข้าเครื่อง HPLC ปริมาณ 50 μ L เปรียบเทียบผลการทดลองเพื่อหาอัตราส่วน mobile phase ที่เหมาะสม

2.7 การแยก OMC ออกจากผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC ด้วย semipreparative HPLC

ฉีดสาร OMC ความเข้มข้น 1,000 ppm ที่ผ่านการตากแดดนาน 15 วัน เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้สภาวะที่ได้จากการทดลองข้างต้น เก็บแต่ละส่วนแยกลงหลอดทดลองแล้วนำแต่ละ fraction ที่ได้ไป

ระเหยเพื่อให้หมดตัวทำละลายโดยใช้ rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 40°C นำส่วนแยกที่เป็นสารผลิตภัณฑ์ไปทำการวิเคราะห์หาโครงสร้างทางเคมี และตรวจสอบความสามารถในการดูดกลืนแสงยูวี

2.8 การหาโครงสร้างทางเคมีของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC

2.8.1 การยืนยันผลโดยใช้ HPLC-APCI-MS

สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ดังนี้

HPLC

- ชนิดของ Column : Lichrosorb RP 18 5 μm 125 \times 8.0 mm
- Detection : 325 nm
- Temperature : 20 °C
- Flow rate 0.5 mL / min
- mobile phase : methanol :H₂O 90:10 (v/v)

MS

- ionization mode : APCI
- cone voltage : 30 V
- source temp. : 120°C
- corona discharge pin voltage : 3.5 kV
- counter electrode : 0.2 kV
- len 2 : 229 V
- len 3 : 9 V

ทำการทดลองกับสารละลาย OMC ที่ผ่านการตากแดดแล้ว

2.8.2 การยืนยันผลโดยใช้ ¹H NMR, ¹³C NMR และ HMQC NMR

ทำการทดลองกับสารทั้งหมด 4 หลอดต่อไปนี้

หลอดที่ 1 : standard OMC

หลอดที่ 2 : standard OMC ที่ผ่านการตากแดดแล้ว

หลอดที่ 3 : OMC ที่แยกได้จากคอลัมน์ semipreparative

หลอดที่ 4 : สารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ OMC ที่แยกได้จากคอลัมน์

semipreparative

2.9 ศึกษาผลกระทบจากชนิดของตัวทำละลายในแง่ของควมมีขั้วของตัวทำละลายและความเข้มข้นของตัวทำละลาย

ทำการเตรียมสารละลาย 10^4 , 10^3 และ 10^2 ppm OMC ในตัวทำละลายต่อไปนี้คือ

mineral oil, hexane, silicone oil, ethyl acetate, ethanol, methanol, propylene glycol และ 80% aqueous ethanol

นำสารละลายแต่ละความเข้มข้นของแต่ละตัวทำละลายไปตรวจสอบอัตราเร็วในการสลายตัวโดยวิธีเดียวกับหัวข้อที่ 2.5

2.10 ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของสาร OMC

นำสารผลิตภัณฑ์ที่แยกได้ในหัวข้อ 2.7 มาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆที่เหมาะสม (หมายถึงความเข้มข้นที่เมื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้วอยู่ในช่วงที่เครื่องตรวจวัดได้) นำสารละลายที่ได้ไปทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible Spectrometer

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3 ผลการทดลองและวิจารณ์

การวิเคราะห์ OMC และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC ด้วย HPLC

สามารถตรวจวัด OMC ด้วย HPLC โดยใช้สภาวะดังนี้ คือ

-Column : Nucleosil 100c-18 5 μm 125 \times 4.0 mm

-mobile phase : methanol 100 %

-flow rate : 0.5 ml / min

-detection : 325 nm

-temperature : 20 °C

-ปริมาณที่ฉีด 25 μL

ต่อไปนี้จะใช้สภาวะดังกล่าวในการวิเคราะห์ OMC ด้วย HPLC ผลการวิเคราะห์ OMC 1,000 ppm (ละลายใน methanol) แสดงในรูปที่ 2

จากโครมาโทแกรมในรูป 2 จะเห็นว่าที่ $t_r = 3.9$ เป็นพีคของ OMC เมื่อเวลาผ่านไปได้นำสารขวดเดียวกันไปทำการทดลองใหม่พบว่าเห็นพีคของ OMC ที่ t_r ตำแหน่งเดิม แต่จะเห็นพีคเล็ก ๆ เกิดขึ้นเพิ่มมาที่ $t_r = 3.6$ ซึ่งคาดว่าจะจะเป็นผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC หรือสารปนเปื้อนที่มากับสารมาตรฐาน OMC แต่เมื่อเวลาผ่านไปนานขึ้นได้นำสารขวดเดิมมาทำการทดลองใหม่อีกครั้งและพบว่าพีคเล็ก ๆ ที่ $t_r = 3.6$ มีขนาดใหญ่ขึ้นจึงสันนิษฐานว่าพีคเล็ก ๆ ที่ $t_r = 3.6$ น่าจะเป็นพีคที่เกิดจากการสลายตัวของสารมาตรฐาน OMC มากกว่าที่จะเป็นสารปนเปื้อน จึงเป็นแนวทางให้ทำการศึกษาต่อไปว่าที่สภาวะอย่างไรที่ OMC เกิดการสลายตัว โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิต่าง ๆ การถูกแสงหรือไม่ถูกแสง และในตัวทำละลายต่างๆ

ผลจากการศึกษาการสลายตัวของสารมาตรฐาน OMC ที่อุณหภูมิของสารละลายต่าง ๆ กัน

เมื่อเก็บสาร OMC ไว้ที่อุณหภูมิ 4 25 32 และ 60 °C ทำการแบ่งสารมาวิเคราะห์ด้วย HPLC และหาพื้นที่ใต้พีคของ OMC (ที่ $t_r = 3.9$) และสารผลิตภัณฑ์ (ที่ $t_r = 3.6$) พบว่าสาร OMC มี

การสลายตัวน้อยมาก ยกเว้นที่ อุณหภูมิ 60°C ซึ่งเริ่มสลายตัวบ้างเล็กน้อยหลังจากเก็บไว้ 25 วัน (ดังรูป 3)

ผลการศึกษาการสลายตัวของสารละลายมาตรฐาน OMC ที่สภาวะถูกแสงและไม่ถูกแสง

ได้ทำการทดลองเก็บ OMC ไว้ในที่มืดและที่สว่าง (ตากแดด) จากนั้นนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกัน ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 4. จากกราฟของ OMC ในที่มีแดดจะพบว่า OMC ไม่มีการสลายตัวแม้จะเก็บไว้นานถึง 1 เดือน แต่เมื่อนำไปตากแดดเพียงวันเดียวก็มีการสลายตัวและมี OMC เหลือเพียงครึ่งเดียว อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะตากแดดนานขึ้นหลายวัน อัตราส่วนของปริมาณ OMC ต่อผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวก็ยังคงอยู่ที่เดิมคือประมาณ 1:1

การชี้เฉพาะสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ OMC เมื่อถูกแสงแดด

การแยกสารผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์เพื่อหา NMR spectrum ของสารผลิตภัณฑ์

ในการชี้เฉพาะหาโครงสร้างของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของ OMC เมื่อถูกแสงแดดนั้น จำเป็นต้องมีการแยกสารดังกล่าวออกมาให้บริสุทธิ์ก่อน เพราะไม่สามารถที่จะหาสภาวะที่ทำให้ OMC แปรสภาพเป็นผลิตภัณฑ์ได้ 100% (ไม่ว่าจะตากแดดนานเพียงใด ปริมาณ OMC ก็ยังคงเหลืออยู่ประมาณครึ่งหนึ่งของปริมาณเริ่มต้น) ในงานวิจัยนี้จึงใช้วิธี Semi-Preparative HPLC ซึ่งในขั้นแรกเป็นการหาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้พีคของ OMC และสารผลิตภัณฑ์แยกออกจากกันอย่างชัดเจน เหตุผลที่ต้องมีการปรับปรุงกระบวนการแยกนี้ก็เพื่อการปนเปื้อนของสารทั้งสองในระหว่างการเก็บส่วนแยก นอกจากนี้เมื่อทำ HPLC-APCI-MS จะได้ไม่เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า “cross over effect” กล่าวคือ สารจากพีคแรกจะไม่ได้มีเหลือตกค้างในห้องไอออนในเซชันเมื่อสารพีคที่สองเข้าไป ซึ่งจะทำให้ได้แมสสเปกตรัมที่สะอาด

โดยในที่นี้ทำการทดลองหาเฟสเคลื่อนที่ที่เหมาะสม โดยแปรอัตราส่วนระหว่าง methanol และ H₂O คือ 100:0, 90:10 และ 80:20 ผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ methanol 100% เป็นเฟสเคลื่อนที่ พีคของสารผลิตภัณฑ์ และ OMC ไม่แยกจากกันอย่างสิ้นเชิงแต่เมื่อใช้ methanol และ H₂O ที่ 90:10 โดยปริมาตร เป็นเฟสเคลื่อนที่ จะมีการแยกที่ชัดเจน และเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำในเฟสเคลื่อนที่ เป็น methanol : H₂O ที่ 80:20 (v / v) การแยกจะยิ่งดีขึ้น แต่การทดลองใช้เวลานานมากขึ้นด้วย จากผลการทดลองดังกล่าวจึงเลือกใช้เฟสเคลื่อนที่ที่เป็น methanol : H₂O ที่ 90:10 (v / v)

เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสมที่จะทำ semipreparative HPLC เพื่อแยกสาร OMC และสารผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC แล้วจึงทำการแยกสารทั้งสองจากสารละลาย OMC เข้มข้น 1,000 ppm ที่ผ่านการตากแดด 2 สัปดาห์ นำแต่ละส่วนที่แยกได้ไปละลายใน CDCl₃ และหา ¹H NMR

เพื่อช่วยในการวิเคราะห์เปรียบเทียบจึงได้ทำการหา ^1H , ^{13}C และ HMQC NMR ของสารมาตรฐาน OMC และของสาร OMC ที่ผ่านการตากแดด (แต่ไม่ผ่านการแยกเอาสาร OMC กับผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวออกจากกัน) ด้วย รูปที่ 5 แสดง ^1H , ^{13}C และ HMQC NMR spectra ของสารมาตรฐาน OMC การวิเคราะห์ NMR spectra ในรูปที่ 5 สามารถบ่งได้อย่างชัดเจนว่าสารมาตรฐาน OMC นี้คือ *octyl-p-methoxy-trans-cinnamate* ตารางที่ 1 แสดงการระบุโปรตอนที่ทำให้ค่า chemical shifts ต่าง ๆ และตารางที่ 2 แสดงการแจกแจงค่า chemical shifts ของคาร์บอนในโครงสร้าง OMC รูปที่ 6 แสดง ^1H และ ^{13}C NMR ของ OMC ที่แยกได้จาก semipreparative column จะเห็นได้ว่า ^1H NMR ของ OMC ที่แยกได้นี้เหมือนกับ ^1H NMR ของสารมาตรฐาน OMC (รูปที่ 5) ดังนั้นจึงยืนยันได้ว่า OMC ที่แยกได้นี้มีโครงสร้างเดียวกับสารมาตรฐาน OMC ซึ่งคือ *octyl-p-methoxy-trans-cinnamate*

สารผลิตภัณฑ์ที่แยกออกมาจากขวดสารของ OMC ที่ผ่านการตากแดด ให้ ^1H และ ^{13}C NMR ดังรูปที่ 7 และตารางที่ 3 ค่า chemical shifts ที่ได้บ่งอย่างชัดเจนว่าสารดังกล่าวมีโครงสร้างเป็น *octyl-p-methoxy-cis-cinnamate*

เมื่อพิจารณา ^1H NMR spectra ของสารผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลายตัวของ OMC (รูปที่ 7) จะพบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของค่า chemical shifts ที่มาจากโปรตอนตำแหน่ง unsaturated ที่ต่อกับวงเบนซีน (D และ E) อย่างชัดเจนและมีการเปลี่ยนค่า chemical shifts ที่ตำแหน่ง C ในวงเบนซีนด้วย เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดจะพบว่าโครงสร้างของสารควรจะเป็น *octyl-p-methoxy-cis-cinnamate*

ดังที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าได้มีการนำสารละลาย OMC ที่ผ่านการตากแดดและไม่ได้ผ่านการแยกเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจาก OMC ไปหา ^1H , ^{13}C และ HMQC NMR spectra รูปที่ 8 แสดง ^1H , ^{13}C และ HMQC NMR spectra ของสารดังกล่าว การแจกแจงค่า chemical shifts ของ ^1H , ^{13}C NMR spectra แสดงไว้ในตารางที่ 4 และ 5

จากข้อมูลของ NMR spectra ของสาร OMC ที่ผ่านการตากแดด เมื่อเปรียบเทียบกับ NMR spectra ของสารมาตรฐาน OMC และของผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC จะพบว่า สาร OMC ที่ผ่านการตากแดดมีองค์ประกอบเพียงสององค์ประกอบเท่านั้นคือ *octyl-p-methoxy-trans-cinnamate* (*trans*-OMC) และ *octyl-p-methoxy-cis-cinnamate* (*cis*-OMC)

สำหรับข้อมูลทาง IR (รูปที่ 12) ของ *trans*-OMC และ *cis*-OMC นั้นมีความคล้ายคลึงกันมาก ซึ่งก็ไม่น่าแปลกใจเพราะสารทั้งสองเป็นเพียง configurational isomer กันเท่านั้น

การทำ HPLC-APCI-MS ของสารละลาย OMC ที่ผ่านการตากแดด

จากการทดลองเรื่องการหาสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร OMC ออกจากสารผลิตภัณฑ์ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการแยกสาร คือ methanol:H₂O 90:10 จึงได้นำสภาวะที่ได้นี้มาทำ HPLC-APCI-MS รูปที่ 9 แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของ OMC สารผลิตภัณฑ์จากการสลายตัว และเฟสเคลื่อนที่ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากแมสสเปกตรัมข้างต้นจะพบว่า ทั้ง OMC และผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวให้แมสสเปกตรัมคล้ายคลึงกัน และให้พีคของ Protonated Molecule ที่ m/z 291 ซึ่งเป็นการยืนยันว่าสารทั้งสองเป็นไอโซเมอร์กัน ส่วนพีคที่ m/z 179 คาดว่าเป็นสาร [H₃CO-(C₆H₄)CH=CHCOOH]H⁺ ซึ่งเกิดจากการแตกออกของพันธะเอสเทอร์ภายในห้องไอออไนเซชัน ส่วนพีคอื่น ๆ มาจากเฟสเคลื่อนที่

การศึกษาผลกระทบจากชนิดของตัวทำละลายในแง่ของควมมีขั้วของตัวทำละลายและความเข้มข้นของตัวทำละลาย

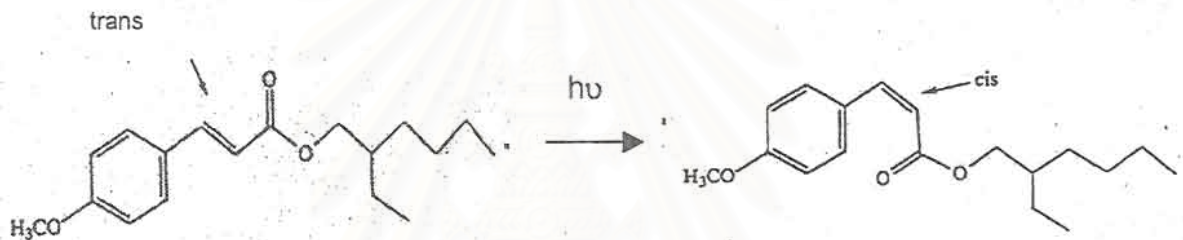
กราฟในรูปที่ 10 แสดงการลดลงของ *trans*-OMC เมื่อนำสารละลาย *trans*-OMC ไปตากแดด จากกราฟสามารถสรุปได้ว่าการลดลงของ *trans*-OMC ซึ่งก็หมายถึงการเปลี่ยน configuration ไปเป็น *cis* นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของตัวทำละลาย โดยที่ความเข้มข้นต่ำๆจะมีปริมาณของ *trans*-OMC ในสมมูลน้อยกว่าที่ความเข้มข้นสูงๆ และในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำๆ เช่น hexane ก็จะมีการเปลี่ยนของ *trans*-OMC ไปเป็น *cis*-OMC ได้ช้าและน้อยกว่าในตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า จากการพยายามวัดอัตราเร็วในการสลายตัวของ OMC เพื่อแสดงผลเป็นสมการแสดงอัตราเร็วของการสลายตัวปรากฏว่าสามารถยืนยันได้ว่าปฏิกิริยาต้องเป็น negative order คือเมื่อความเข้มข้นของสารตั้งต้น (*E*-OMC) เพิ่มขึ้น อัตราการสลายตัวกลับช้าลง อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลที่มีทั้งหมดยังไม่สามารถหาสมการทางคณิตศาสตร์มาเป็นตัวแทนของอัตราเร็วในการสลายตัวนี้ได้

ศึกษาสมบัติการดูดกลืนแสงยูวีของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของสาร OMC

เมื่อนำสาร *cis*-OMC ที่แยกได้จาก HPLC คอลัมน์ มาเตรียมเป็นสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆที่เหมาะสม และนำสารละลายที่ได้ไปทำการตรวจวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV-visible Spectrometer (รูปที่ 12) พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากัน *cis*-OMC มีความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีที่ต่ำกว่า *trans*-OMC อย่างชัดเจน ผลการทดลองนี้จึงสอดคล้องกับข้อมูลเบื้องต้นที่พบว่าเมื่อนำสารกรองรังสียูวี OMC (ซึ่งก็คือ *trans*-OMC) ไปตากแดด การดูดกลืนรังสียูวีจะลดลงเรื่อยๆ ดังนั้นจึงอธิบายได้ว่าปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนั้นเนื่องมาจาก *trans*-OMC เปลี่ยนไปเป็น *cis*-OMC ซึ่งมีความสามารถในการกรองรังสียูวีที่ลดลง

4 สรุปผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อสารกรองรังสียูวี octyl methoxycinnamate หรือ OMC ถูกแสงแดด จะมีการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างดังสมการข้างล่างนี้



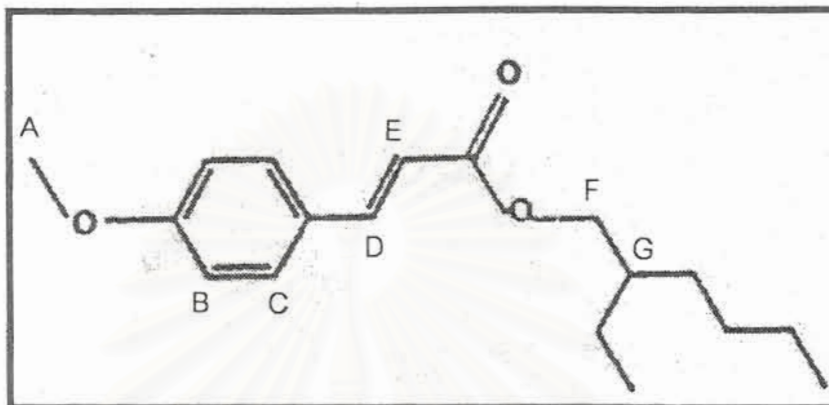
การชี้เฉพาะ โครงสร้างที่เปลี่ยนไปจาก *trans* เป็น *cis* นั้นทำโดยใช้วิธีทาง NMR (¹H, ¹³C, HMQC) และ HPLC-APCI-MS ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีการชี้เฉพาะด้วยหลักฐานอย่างชัดเจนถึงการเปลี่ยนแปลง โครงสร้างดังกล่าวเมื่อ OMC ถูกแสง

การทดลองติดตามการเปลี่ยน configuration ดังกล่าวพบว่าอัตราเร็วและสมดุลระหว่าง *trans* กับ *cis* นั้นแปรตามความเข้มข้นของ OMC และชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ โดยที่ความเข้มข้นของ OMC ต่ำๆจะมีปริมาณของ *cis*-OMC ในสมดุลมากกว่าที่ความเข้มข้นสูงๆ และในตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำๆ เช่น hexane ก็จะมีการเปลี่ยนของ *trans*-OMC ไปเป็น *cis*-OMC ได้ช้าและน้อยกว่าในตัวทำละลายที่มีขั้วมากกว่า

การทดลองตรวจวัดความสามารถในการกรองรังสียูวีของ *trans*- และ *cis*-OMC พบว่า *cis*-OMC มีความสามารถในการดูดกลืนรังสียูวีที่ต่ำกว่า *trans*-OMC อย่างชัดเจน



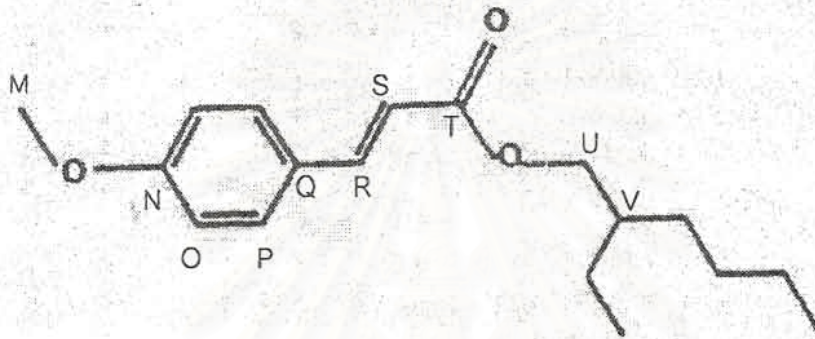
ตารางที่ 1 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสารมาตรฐาน OMC (ดูรูปที่ 5a)



$\delta(\text{ppm})$	โปรตอน
0.86-0.93 (m)	H
1.30-1.46 (m)	I
1.63 (s)	G
3.81 (s)	A
4.10 (d, $J = 6$ Hz)	F
6.29 (d, $J = 16$ Hz)	E
6.87 (d, $J = 7$ Hz)	B
7.40 (d, $J = 7$ Hz)	C
7.61 (d, $J = 16$ Hz)	D

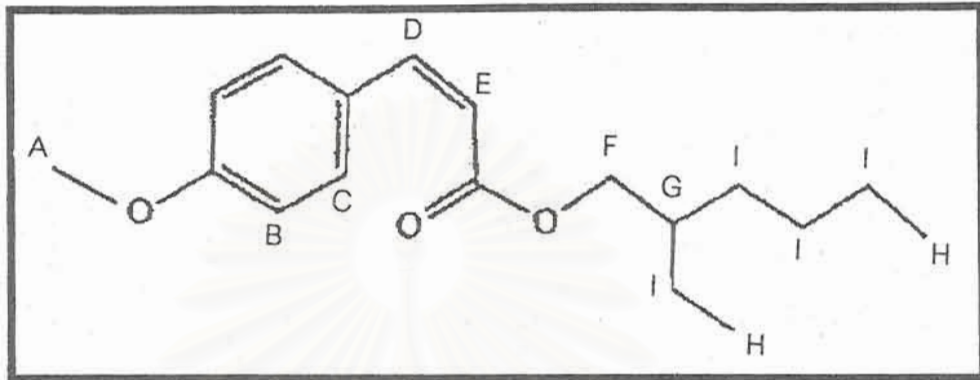
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดง resonance ของ ^{13}C NMR ของสารมาตรฐาน OMC (ดูรูปที่ 5b)



δ (ppm)	คาร์บอน
38.9	V
55.3	M
66.8	U
114.3	O
115.8	S
127.2	Q
129.7	P
144.1	R
161.3	N
167.5	T

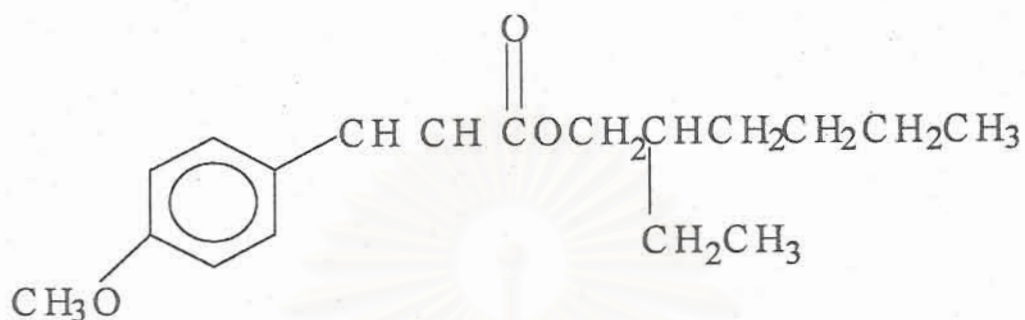
ตารางที่ 3 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่เกิดจาก OMC (รูปที่ 7)



$\delta(\text{ppm})$	โปรตอน
0.82-0.89 (m)	H
1.24-1.35 (m)	I
1.58 (s)	G
3.81 (s)	A
4.05 (d, $J = 6 \text{ Hz}$)	F
5.82 (d, $J = 12 \text{ Hz}$)	E
6.80 (d, $J = 7 \text{ Hz}$)	B
6.82 (d, $J = 12 \text{ Hz}$)	D
7.66 (d, $J = 7 \text{ Hz}$)	C

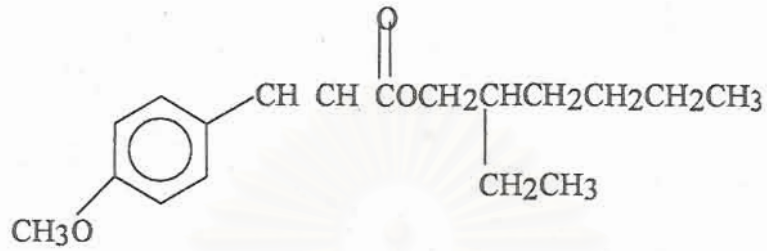
ศูนย์บริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดง resonance ของ ^1H NMR ของสาร OMC ที่ผ่านการตากแดดแต่ไม่ได้แยก
(รูปที่ 8)

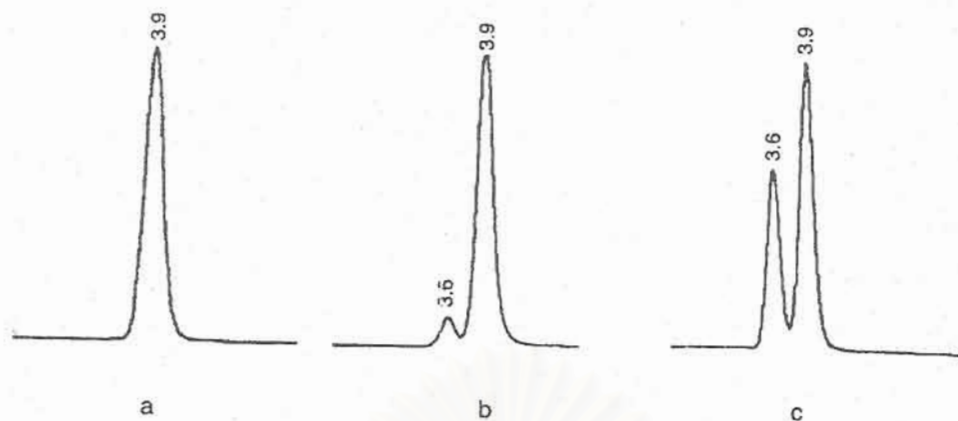


δ (ppm)	โปรตอน
0.82-0.94 (m)	H
1.24-1.47 (m)	I
1.58-1.62 (s)	G
3.81 (s)	A
4.05 (d, J = 6 Hz)	F(<i>cis</i>)
4.10 (d, J = 6 Hz)	F(<i>trans</i>)
5.82 (d, J = 12 Hz)	E(<i>cis</i>)
6.29 (d, J = 16 Hz)	E(<i>trans</i>)
6.80 (d, J = 7 Hz)	B(<i>cis</i>)
6.82 (d, J = 12 Hz)	D(<i>cis</i>)
6.87 (d, J = 7 Hz)	B(<i>trans</i>)
7.40 (d, J = 7 Hz)	C(<i>trans</i>)
7.61 (d, J = 16 Hz)	D(<i>trans</i>)
7.66 (d, J = 7 Hz)	C(<i>cis</i>)

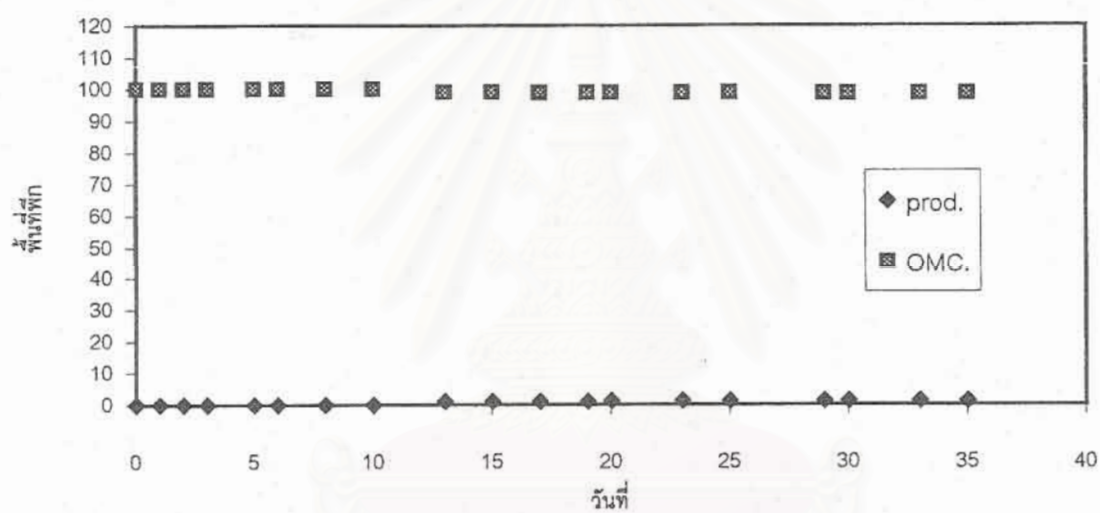
ตารางที่ 5 แสดง resonance ของ ^{13}C NMR ของสาร OMC ที่ผ่านการตากแดดแต่ไม่ได้แยก
(รูปที่ 8)



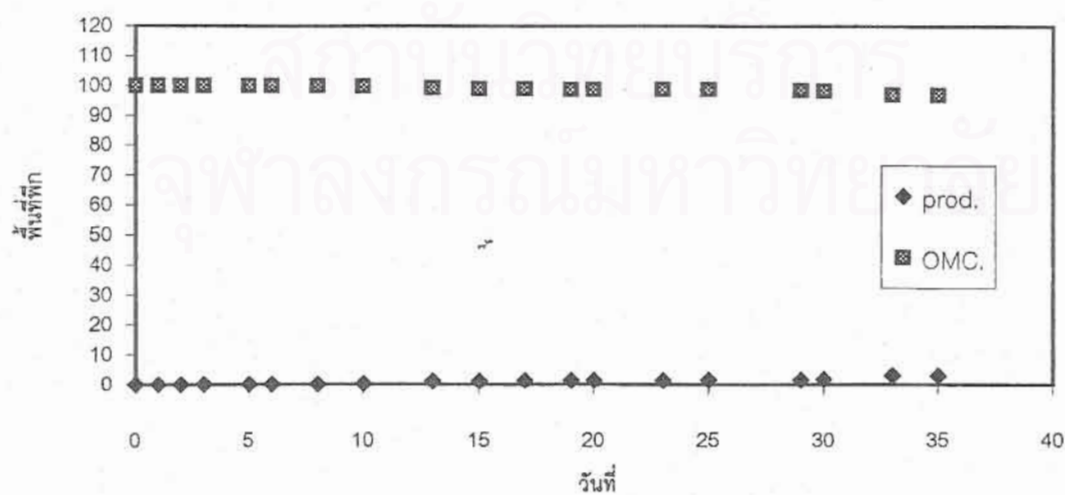
δ (ppm)	คาร์บอน
38.7	V
55.3	M(cis)
66.7	U(cis)
113.4	O(cis)
114.3	O(trans)
115.8	S(trans)
117.4	S(cis)
127.2	Q
129.7	P(trans)
132.0	P(cis)
143.0	R(cis)
144.1	R(trans)
161.3	N
168.0	T



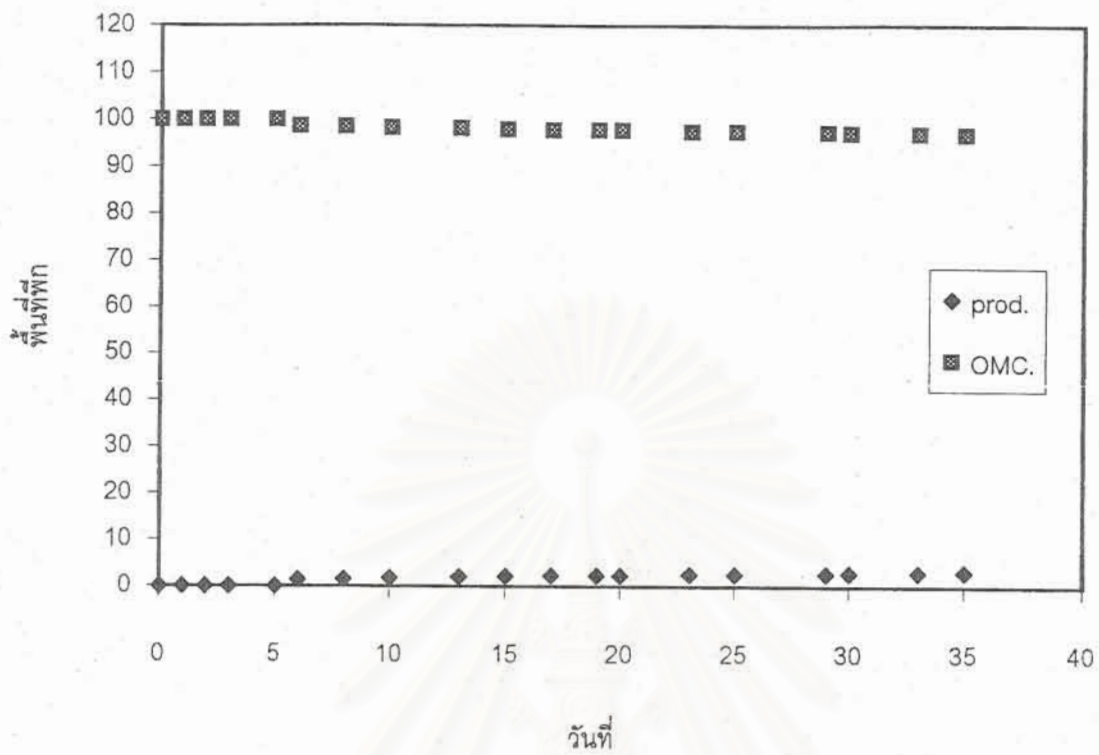
รูปที่ 2 แสดงโครมาโทแกรมของสารมาตรฐาน OMC ที่ความเข้มข้น 1000 ppm



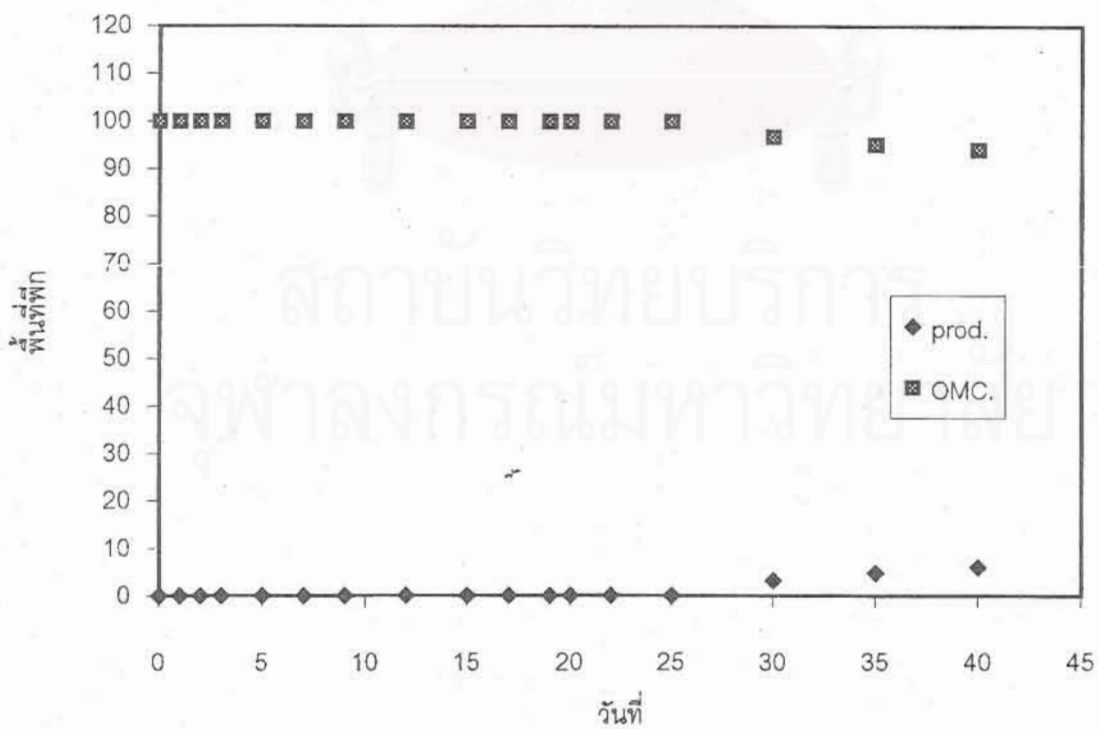
รูปที่ 3a แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสถานะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 4°C



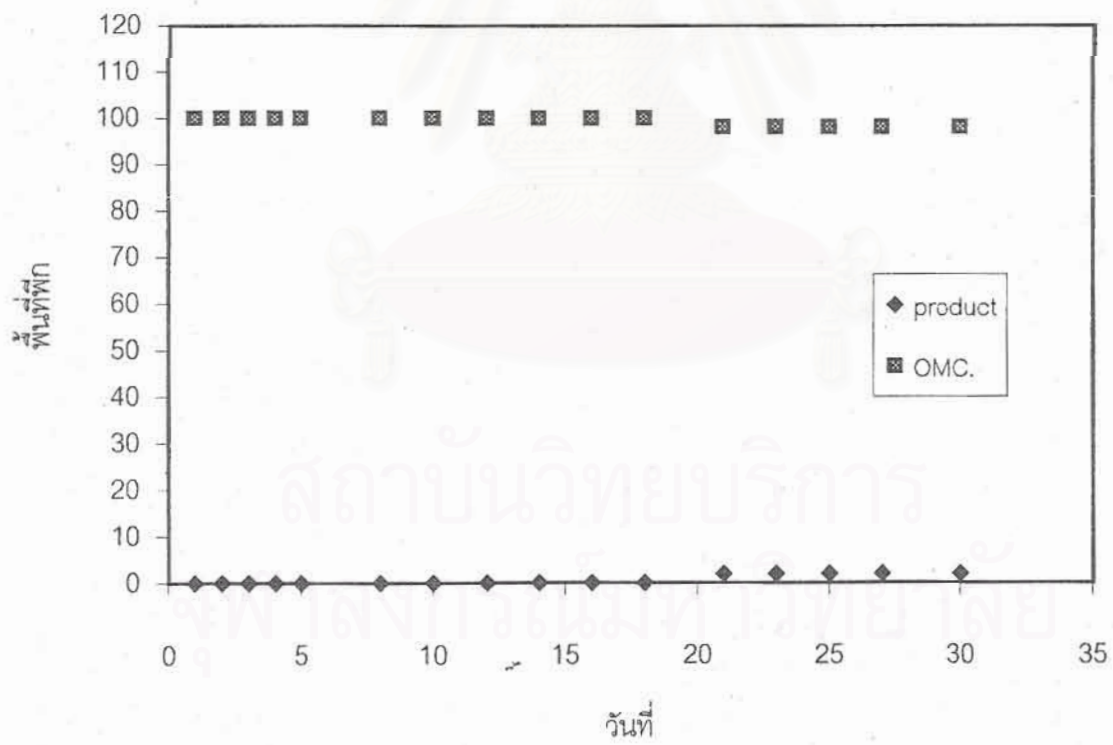
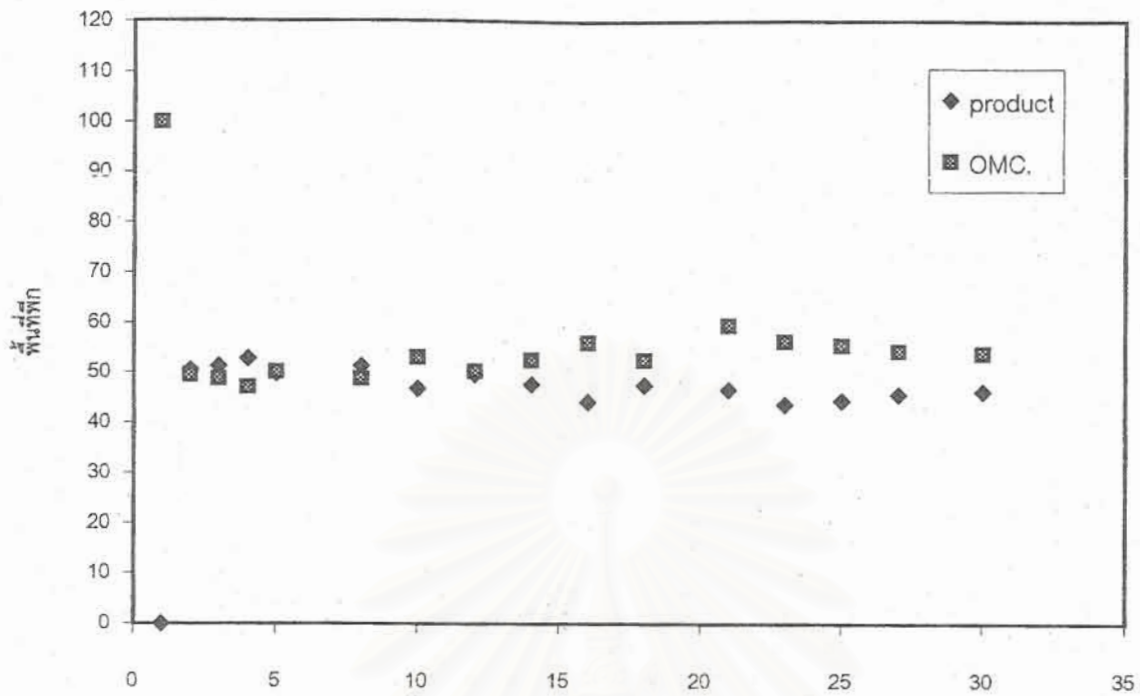
รูปที่ 3b แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสถานะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 25°C



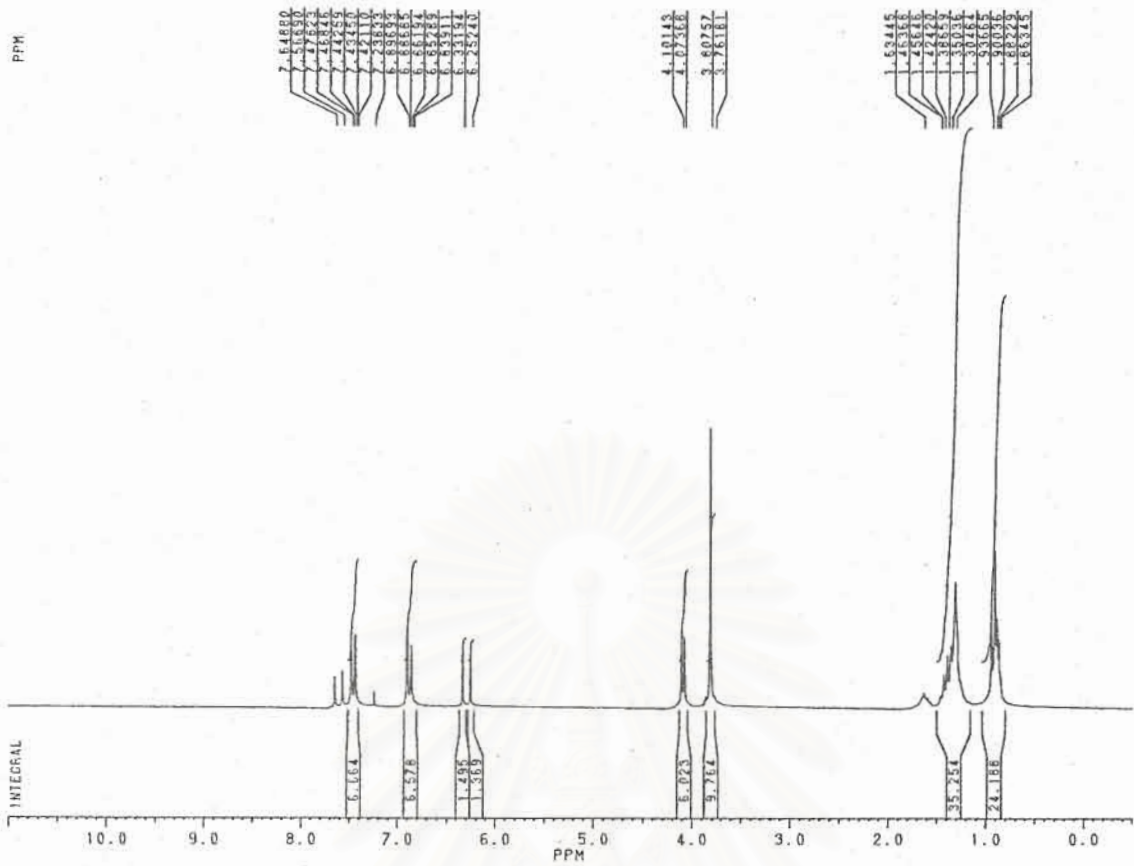
รูปที่ 3c แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสถานะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 32°C



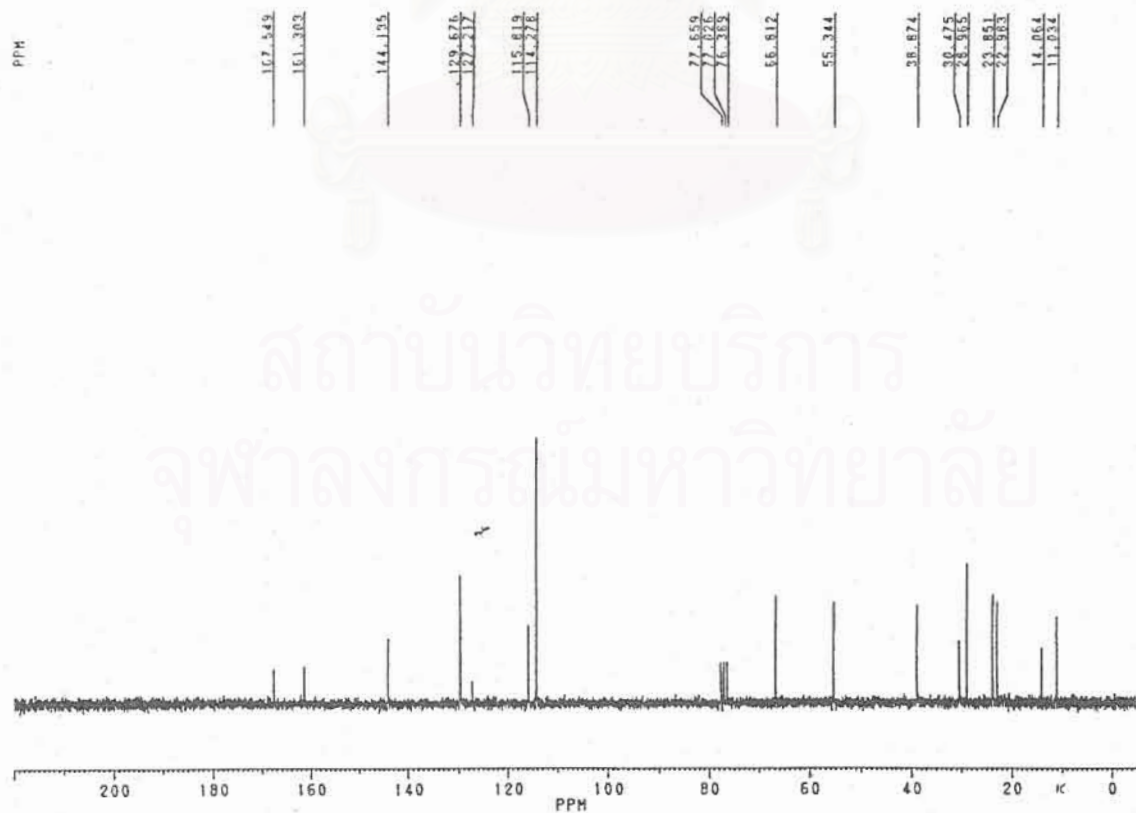
รูปที่ 3d แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสถานะที่ไม่ถูกแสงที่อุณหภูมิ 60°C



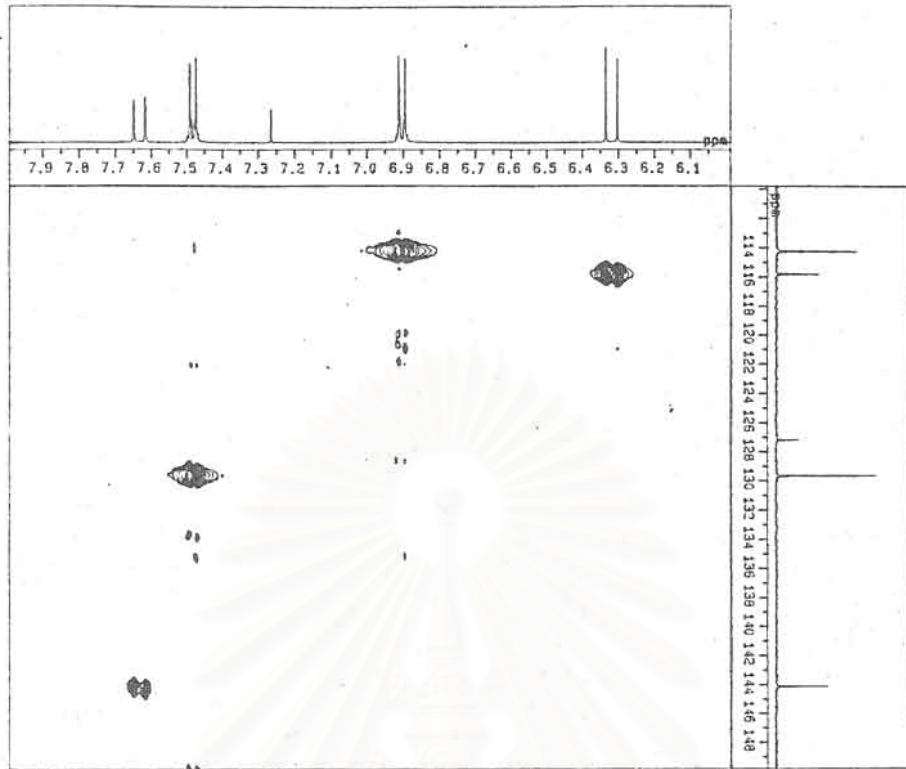
รูปที่ 4 แสดงกราฟการสลายตัวของ OMC เมื่อเก็บไว้ในสถานะที่ถูกแสง (บน) และไม่ถูกแสง (ล่าง)



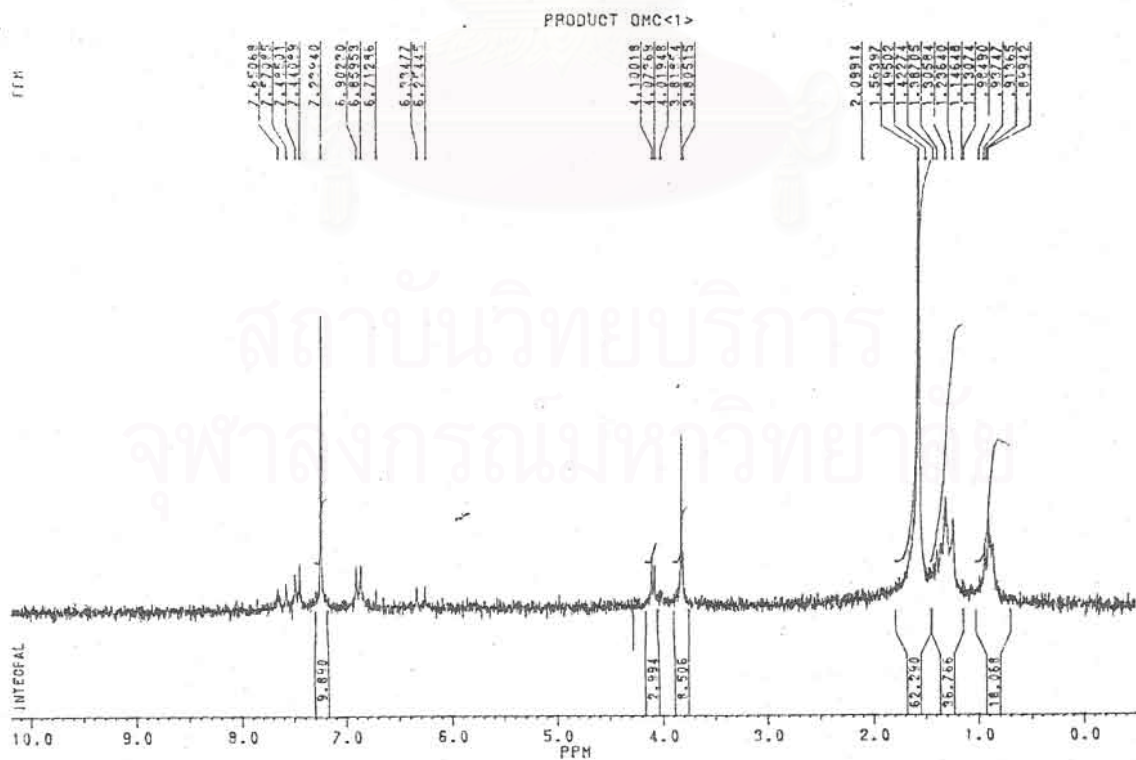
รูปที่ 5 a แสดง ^1H NMR ของ สารมาตรฐาน OMC



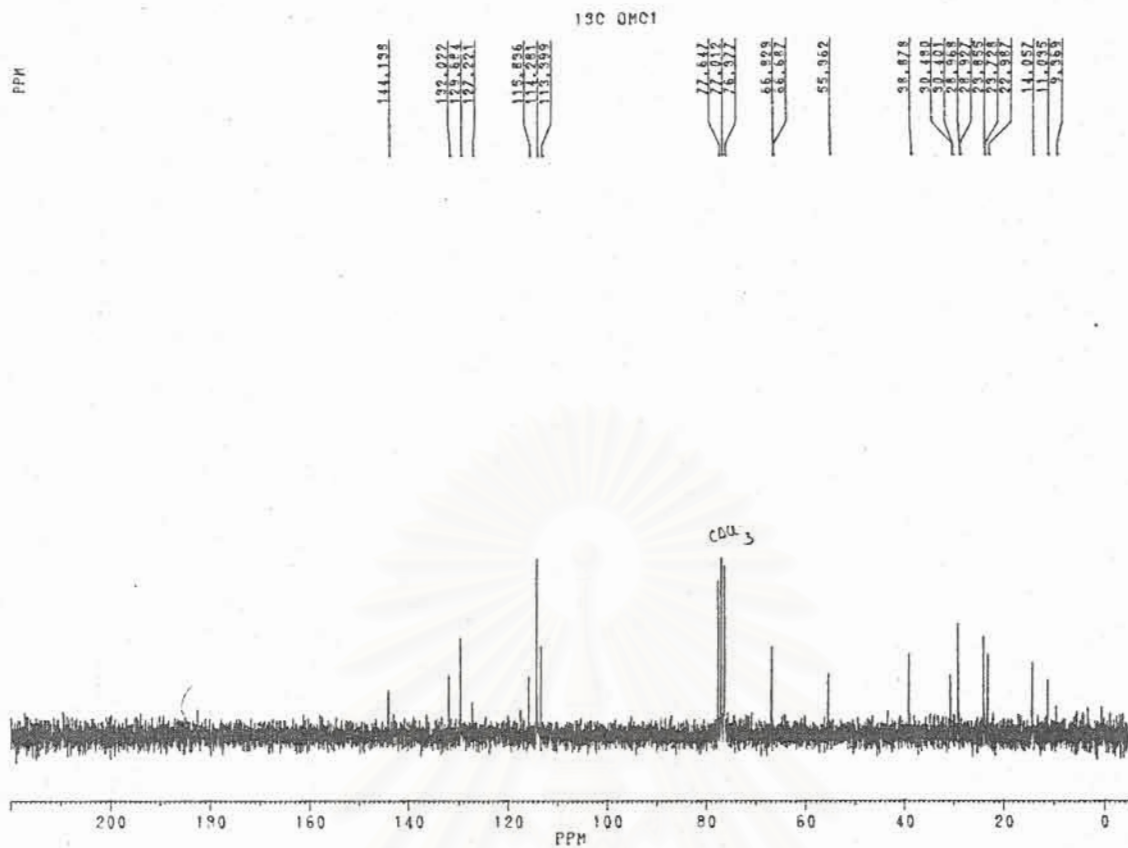
รูปที่ 5 b แสดง ^{13}C NMR ของ สารมาตรฐาน OMC



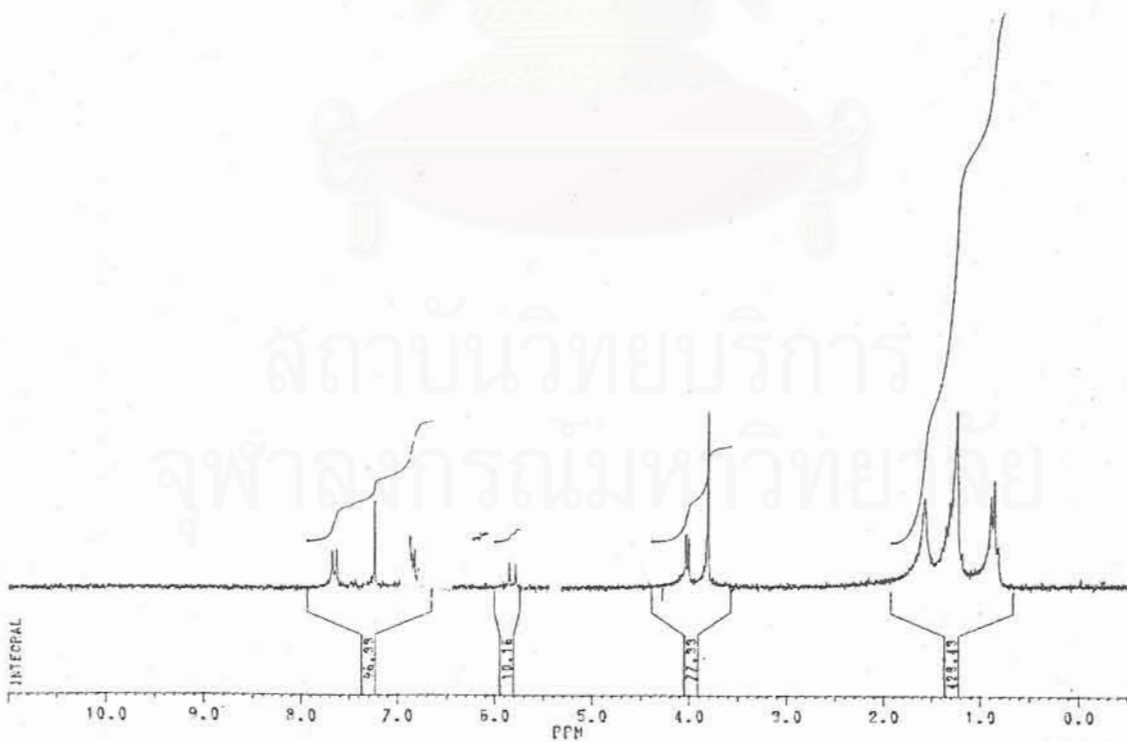
รูปที่ 5 c แสดง HMQC NMR ของ สารมาตรฐาน OMC



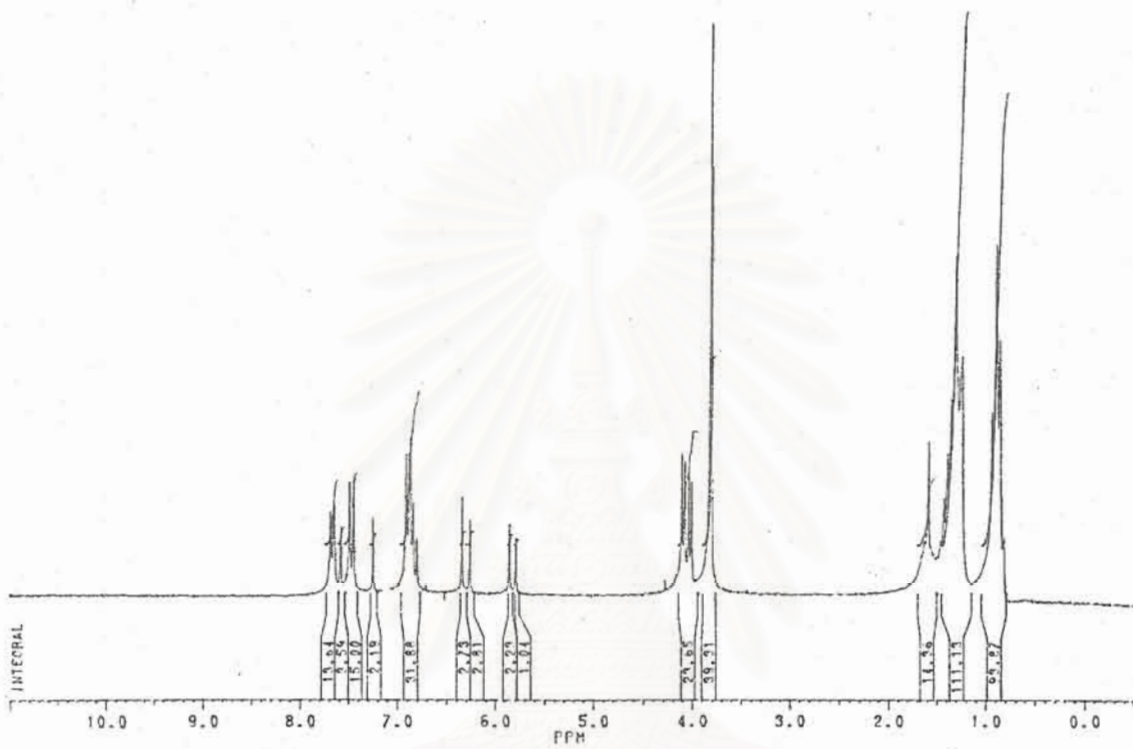
รูปที่ 6 a แสดง ^1H NMR ของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column



รูปที่ 6 b แสดง ¹³C NMR ของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column

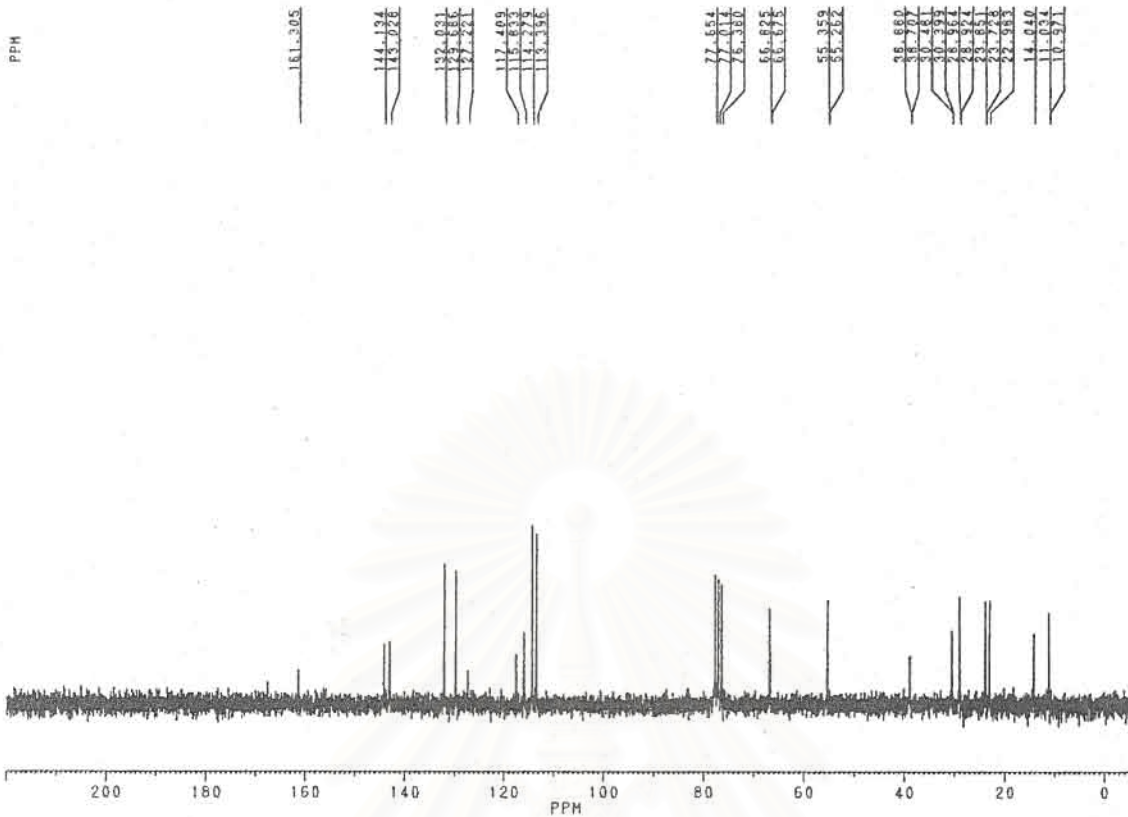


รูปที่ 7 แสดง ¹H NMR ของสารผลิตภัณฑ์ที่มาจากการสลายตัวของ OMC ที่แยกออกมาจาก semipreparative column

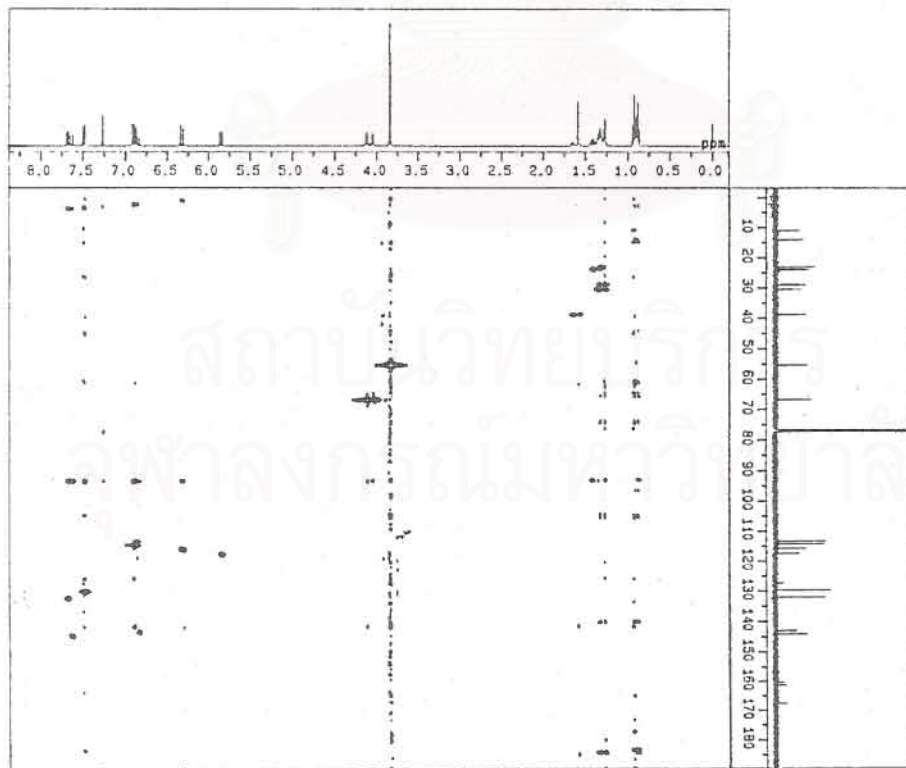


รูปที่ 8 a แสดง ^1H NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก

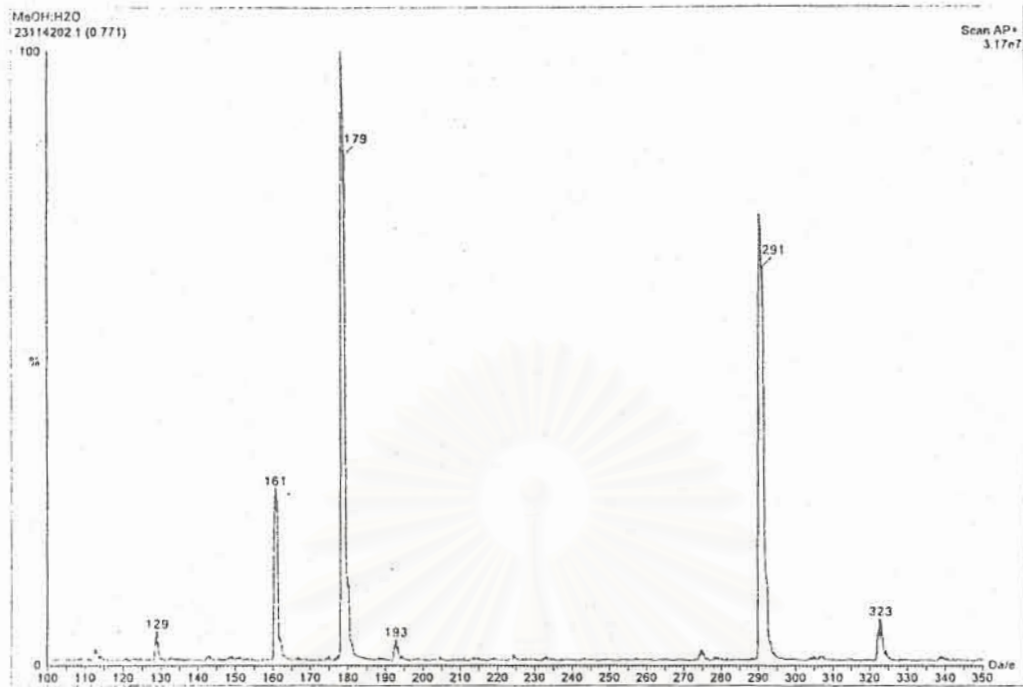
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



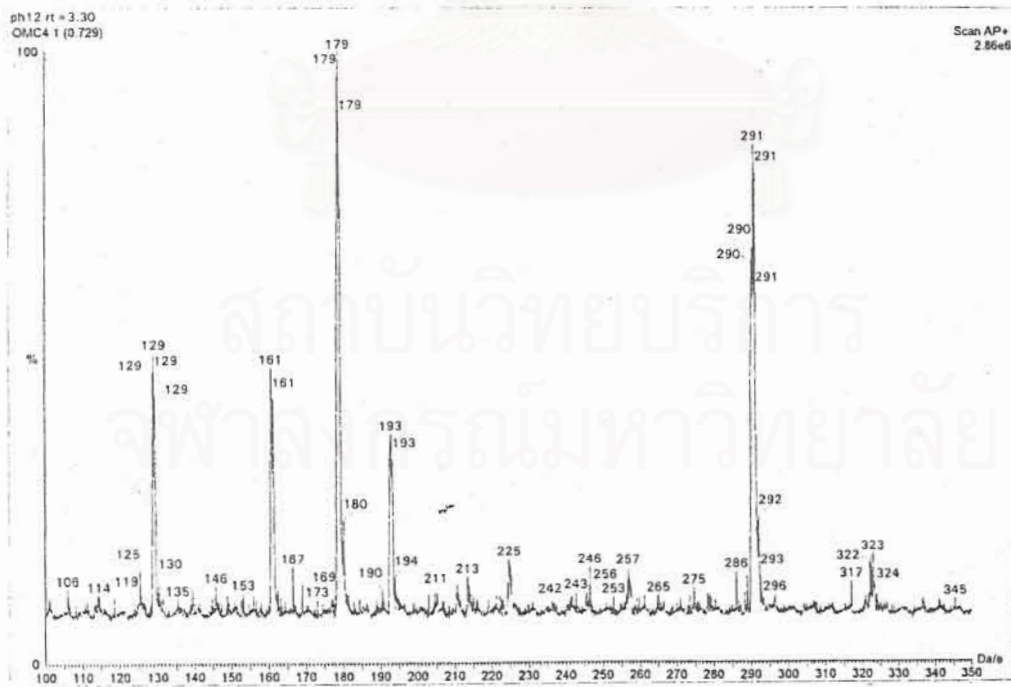
รูปที่ 8 b แสดง ^{13}C NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก



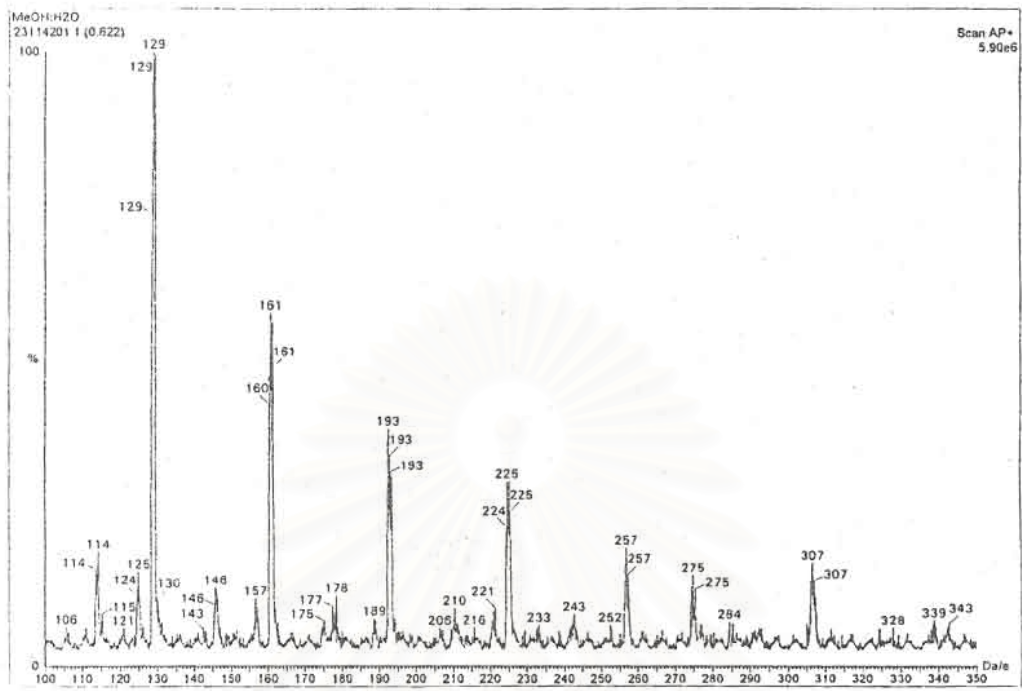
รูปที่ 8 c แสดง HMQC NMR ของ OMC ที่ผ่านการตากแดดและยังไม่แยก



รูปที่ 9 a แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของ OMC

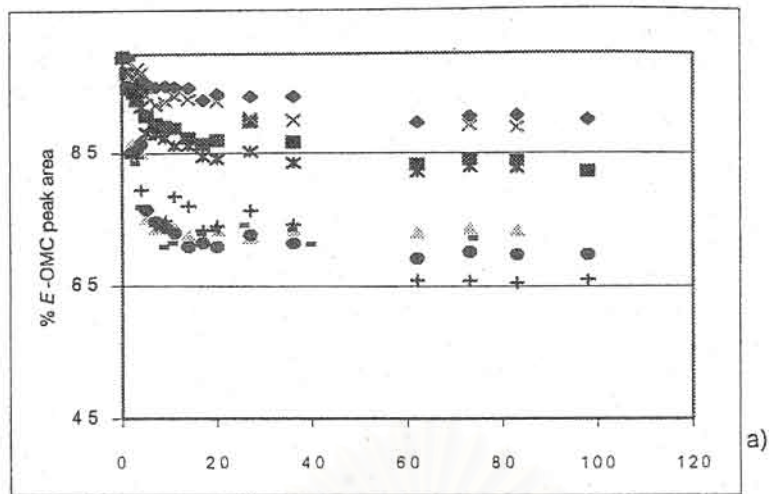


รูปที่ 9 b แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของ สารผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวของ OMC

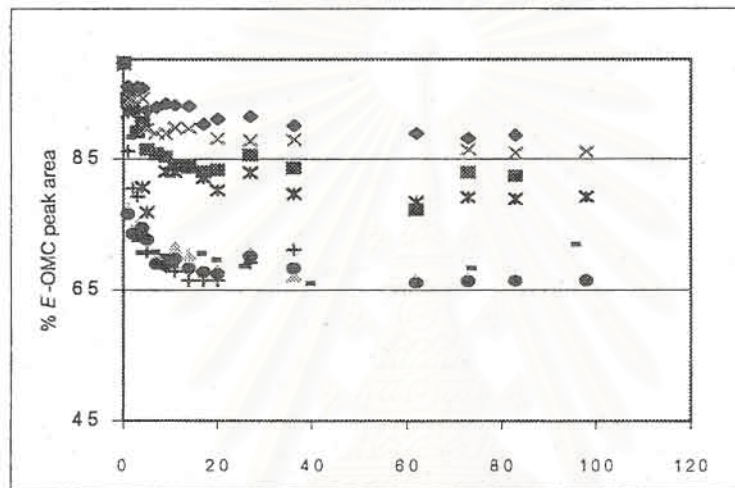


รูปที่ 9 c แสดง APCI-แมสสเปกตรัมของเฟสเคลื่อนที่

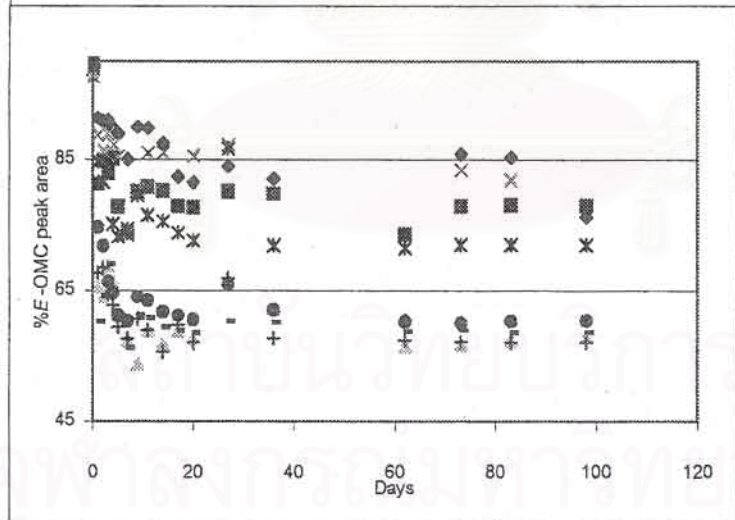
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



a)

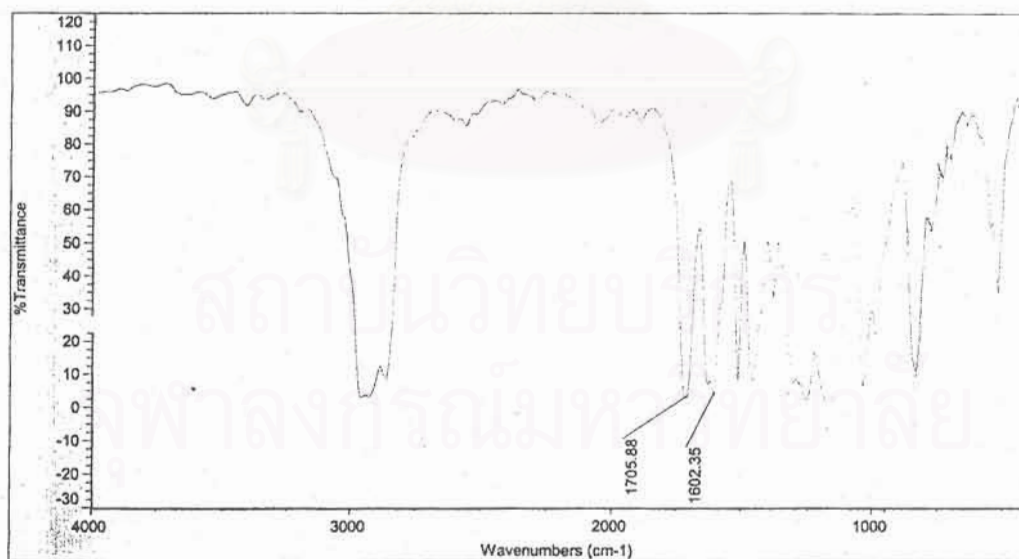
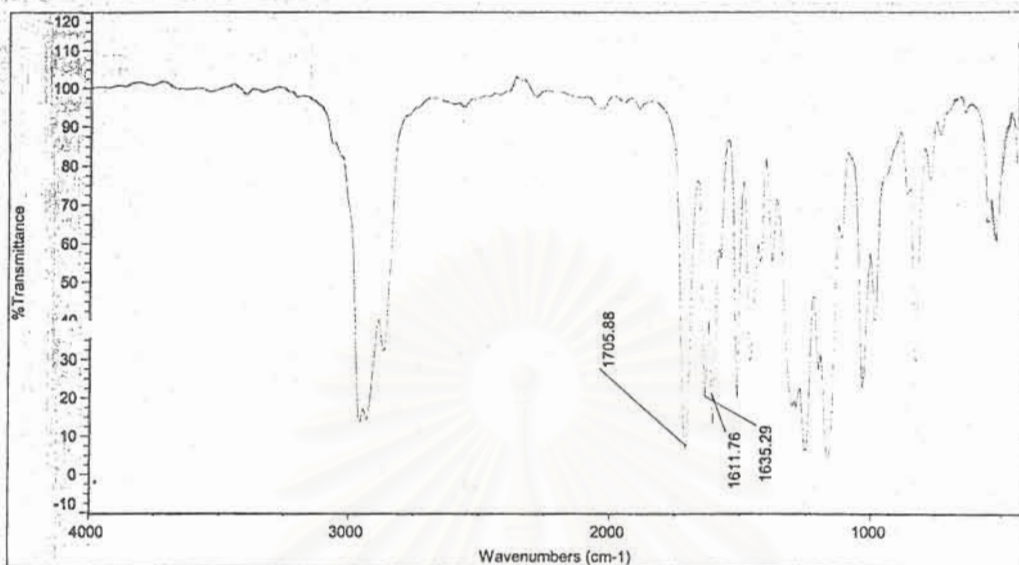


b)

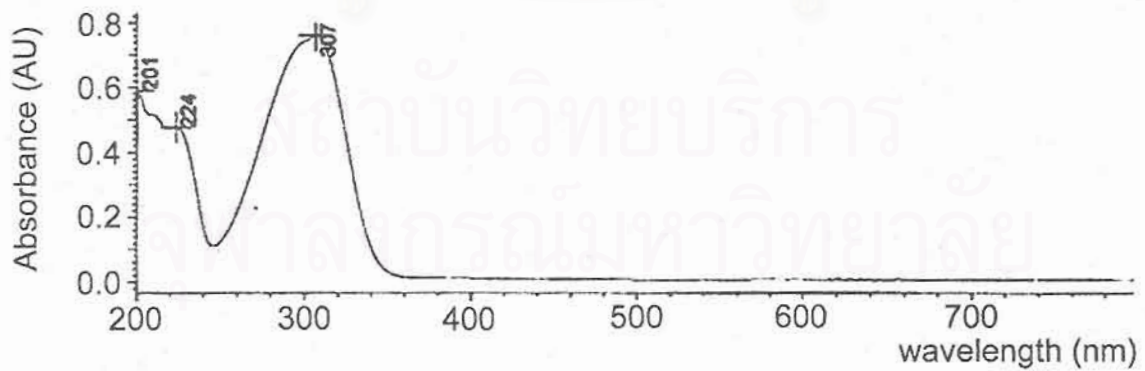
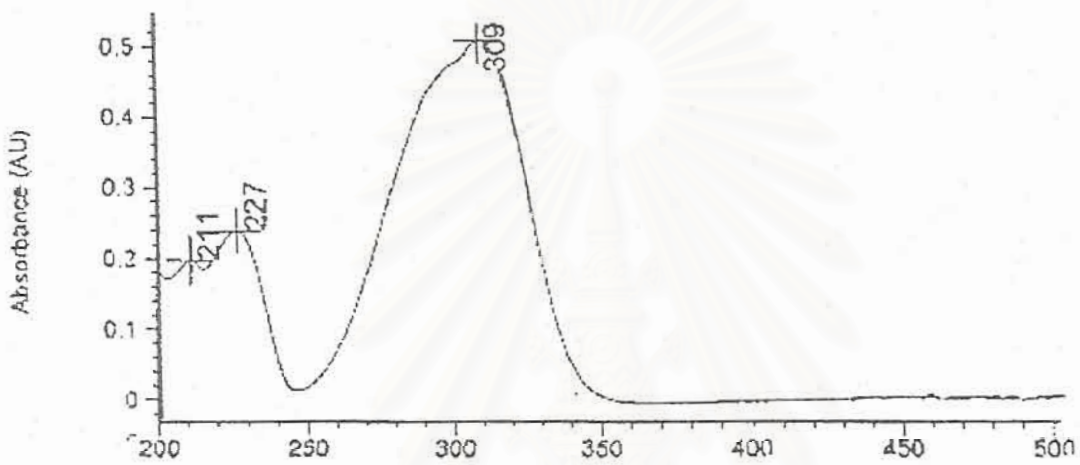


c)

รูปที่ 10 การเปลี่ยน configuration ของ E-OMC ที่ความเข้มข้นต่างๆในตัวทำละลายต่างๆ เมื่อนำสารละลายไปตากแดด a) 10^4 ppm b) 10^3 ppm และ c) 10^2 ppm โดยที่ \blacklozenge mineral oil \blacksquare hexane \blacktriangle silicone oil \blacklozenge ethylacetate \bullet ethanol $-$ methanol \cdots propylene glycol และ $+$ ethanol 80%



รูปที่ 11 Infra-Red Spectrum ของ *trans*-OMC (บน) และ *cis*-OMC (ล่าง)



รูปที่ 12 UV-Visible Spectrum ของ 6 ppm *trans*-OMC (บน) และ 10 ppm *cis*-OMC (ล่าง)

เอกสารอ้างอิง

1. Setlow, R.B., Grist, E. Thompson, K., Woodhead, A.D. Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 6666-6670 (1993).
2. Armstrong, B.K., Kricger, A., English, D.R. Sun exposure and skin cancer. *Australasian J. Dermatol.* 58, S1-S6 (1997).
3. Urbach, F. Ultraviolet radiation and skin cancer of humans. *J. Photochem. Photobiol. B* 40, 3-7 (1997).
4. Kimura, K. and Katoh, T. Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen ethylhexyl-p-methoxycinnamate (Parsol MCX). *Contact Dermatitis* 32, 304-305 (1995).
5. Schauder S. and Ippen, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15-year experience and of the literature. *Contact Dermatitis* 37, 221-32 (1997).
6. Jiang, R., Hayden, C.G.J., Pranker, R.J., Roberts, M.S. and Benson H.A.E. High-performance liquid chromatographic assay for common suncreening agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. *J. Chromatogr. B* 682, 137-145 (1996).
7. Meijer, J. and Loden, M. Stability analysis of three UV-filters using HPLC. *J. Liq. Chromatogr.* 18, 1821-1832 (1995).
8. Ikeda, K., Suzuki, S. and Watanabe, Y. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chrom.* 21, 240-245 (1989).
9. Tarras-Wahlberg, N., Stenhagen, G., Larko, O., Rosen, A., Wennberg, A. and Wennerstrom, O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 113, 547-553 (1999).

Stability of octyl methoxycinnamate and identification of its photo-degradation product

ศ.ดร. วิมลปัทมา (พินิจกุล)

S. Pattanaargson and P. Limphong

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

Keywords: octyl methoxycinnamate, photo-degradation, sunscreen

Synopsis

A stability study of octyl methoxycinnamate (OMC) using C-18 HPLC indicated that OMC degraded into a new product when exposed to sunlight. When kept in the dark at 4, 20, 32 and 60 °C for one month, no degradation of OMC was detected. Online HPLC-APCI-MS revealed similar APCI mass spectra for OMC and its degradation product. Isolation of the photo-degradation product was done using semi-preparative HPLC. NMR spectra of OMC and the isolated photo-degradation product indicated the change from an *E*-octyl-*p*-methoxycinnamate into a *Z*-octyl-*p*-methoxycinnamate. NMR spectra of the unfractionated-light-exposed-OMC showed that the *Z*-OMC was the only product generated.

Résumé

Une étude de stabilité de l'octyl-méthoxycinnamate (OMC) utilisant l'HPLC en C-18 indique que l'OMC se dégrade en un nouveau produit lorsqu'il est exposé à la lumière du soleil. Lorsqu'il est maintenu dans le noir à 4, 20, 32 et 60 °C durant un mois, aucune dégradation de l'OMC n'est observée. La technique HPLC-APCI-MS enchaînée révèle des spectres de masse en APCI similaires pour l'OMC et son produit de dégradation. L'isolement du produit de photodégradation est effectué en utilisant l'HPLC semi-préparative. Les spectres RMN de l'OMC et du

produit de photodégradation isolé indique la transformation du *E*-octyl-*p*-méthoxycinnamate en *Z*-octyl-*p*-méthoxycinnamate. Les spectres de RMN de l'OMC non fractionné exposé à la lumière montrent que le *Z*-OMC est le seul produit généré.

Introduction

Octyl methoxycinnamate (OMC, Fig. 1) is a widely used sunscreen in various cosmetic formulations because of its large extinction coefficient in various solvents in the UV-B region. Only few photosensitization and/or photoallergic reactions induced by this compound have been reported [1, 2]. Qualitative and quantitative analyses of OMC can be done using reverse phase high performance liquid chromatography (HPLC) [3–5]. This UV filter has been shown to be light sensitive with a decrease in UV absorption efficiency upon light exposure [6]. Analysis of this compound after light exposure by reverse phase HPLC revealed a new peak and therefore indicated an accumulation of a new product [4]. It has been speculated that a *E* to *Z* configuration change occurs upon light exposure [4, 6]. This speculation was probably based on the report of a *E* to *Z* photo-isomerization of cinnamic acids and cinnamic acid esters [7, 8]. A study of photo-isomerization of OMC has been done using steady state and laser flash photolysis [9]. This paper presents the HPLC-isolation of the OMC's photo-degradation product generated by exposing the OMC to the sunlight. Identification of the structure of this photo-degradation product was done by NMR and HPLC-APCI-MS.

Correspondence: Dr S. Pattanaargson. Tel.: +662 2184986; fax: +662 6121989; e-mail: pspupason@netserv.chula.ac.th

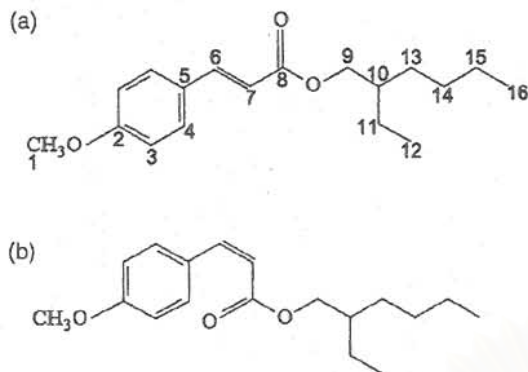


Figure 1 Structure of *E*-octyl-*p*-methoxycinnamate (original OMC) (a) and *Z*-octyl-*p*-methoxycinnamate (photo-degradation product of OMC) (b).

Materials and methods

Materials

Standard OMC was obtained from Merck Co. Ltd (Bangkok, Thailand), and was kept in a lightproof container at 0 °C.

OMC degradation study

Stock OMC solution of 1000 p.p.m. was prepared in methanol and this solution was kept away from light at 4 °C. The stock solution was divided into two parts; one kept in a closed glass container under sunlight at a temperature of around 32 °C, the other was kept

in a lightproof container at 32 °C. Each solution was withdrawn for HPLC analysis at the appropriate time.

High performance liquid chromatography

The HPLC system consisted of a Model 662 pump (Waters Corp., Milford, USA), a manual injector (Rheodyne, Cotatic, USA), a Model 486MS variable-wavelength UV detector (Waters Corp.) and a Model 600 S controller (Waters Corp.). Chromatograms and peak area were processed using PC 800, Version 2.0 software.

Following the degradation of OMC by HPLC. Analysis during the OMC degradation study was done using a Nucleosil 100C analytical column (particle size 5 µm, 125 × 4.0 mm I.D.; VDS optilap, Berlin, Germany) at 25 °C. The mobile phase used was pure methanol at a flowrate of 0.5 mL min⁻¹. The UV detector was set at 325 nm. The withdrawn sample was diluted 100 times with methanol before injection. Twenty-five µL of the diluted sample was injected for each analysis. All experiments were done in duplicate.

Isolation of photo-degradation product using semi-preparative HPLC. Collection of OMC and its degradation product was done at 25 °C using a Lichrosorb RP 18 column (particle size 5 µm, 125 × 8.0 mm I.D.; VDS optilap, Berlin, Germany). The mobile phase

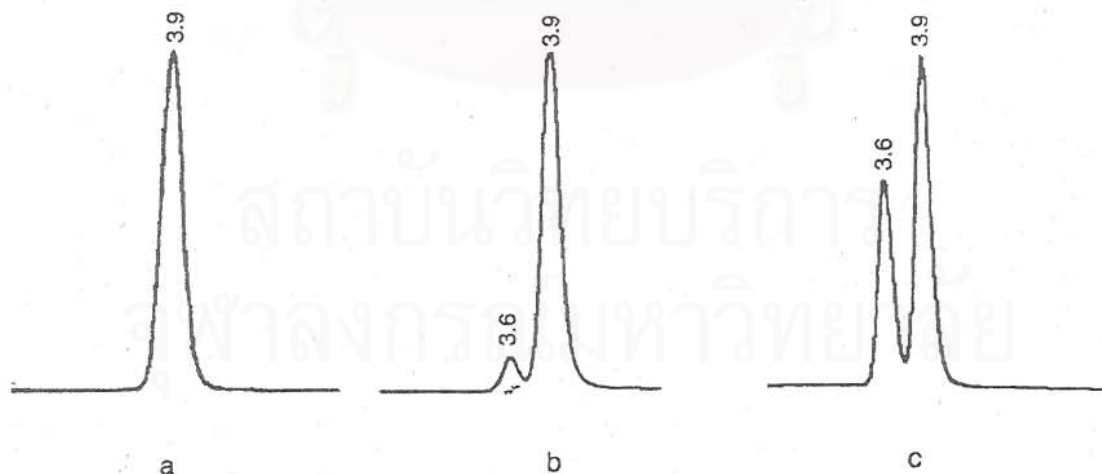


Figure 2 Chromatograms of standard OMC before (a) and after (b) and (c) light exposure. The HPLC was done using a Nucleosil 100C analytical column at 25 °C. The mobile phase used was pure methanol at the flowrate of 0.5 mL min⁻¹. The UV detector was set at 325 nm. The 1000 p.p.m. OMC stock solution was diluted 100 times with methanol before injection. Twenty-five µL of the diluted sample was injected for each analysis.

used was methanol:water (90 : 10 v/v) at a flowrate of 0.5 ml/min. The UV detector was set at 325 nm. The sample injection volume was 50 μ l. Care was taken to prevent the collected fractions from being exposed to light.

Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy of the OMC and the photo-degradation product

^1H NMR was done on Cryomagnet NMR Spectroscopy BZH 200/52 (Spectrospin, Oxford Instruments; Bruker, Germany).

HMQC NMR was done on FT-NMR, JNM-A500 (JEOL, Japan).

The isolated OMC and the isolated photo-degradation product obtained from semi-preparative HPLC were dried under vacuum without exposure to light. The two dried fractions were dissolved in CDCl_3 and subjected to NMR spectroscopy.

The unfractionated 1000 p.p.m. OMC stock solution that had been exposed to sunlight for 15 days was also dried and dissolved in CDCl_3 before subjected to NMR spectroscopy.

Standard OMC (kept in the dark at 4 $^\circ\text{C}$) was dissolved in CDCl_3 and subjected to NMR spectroscopy.

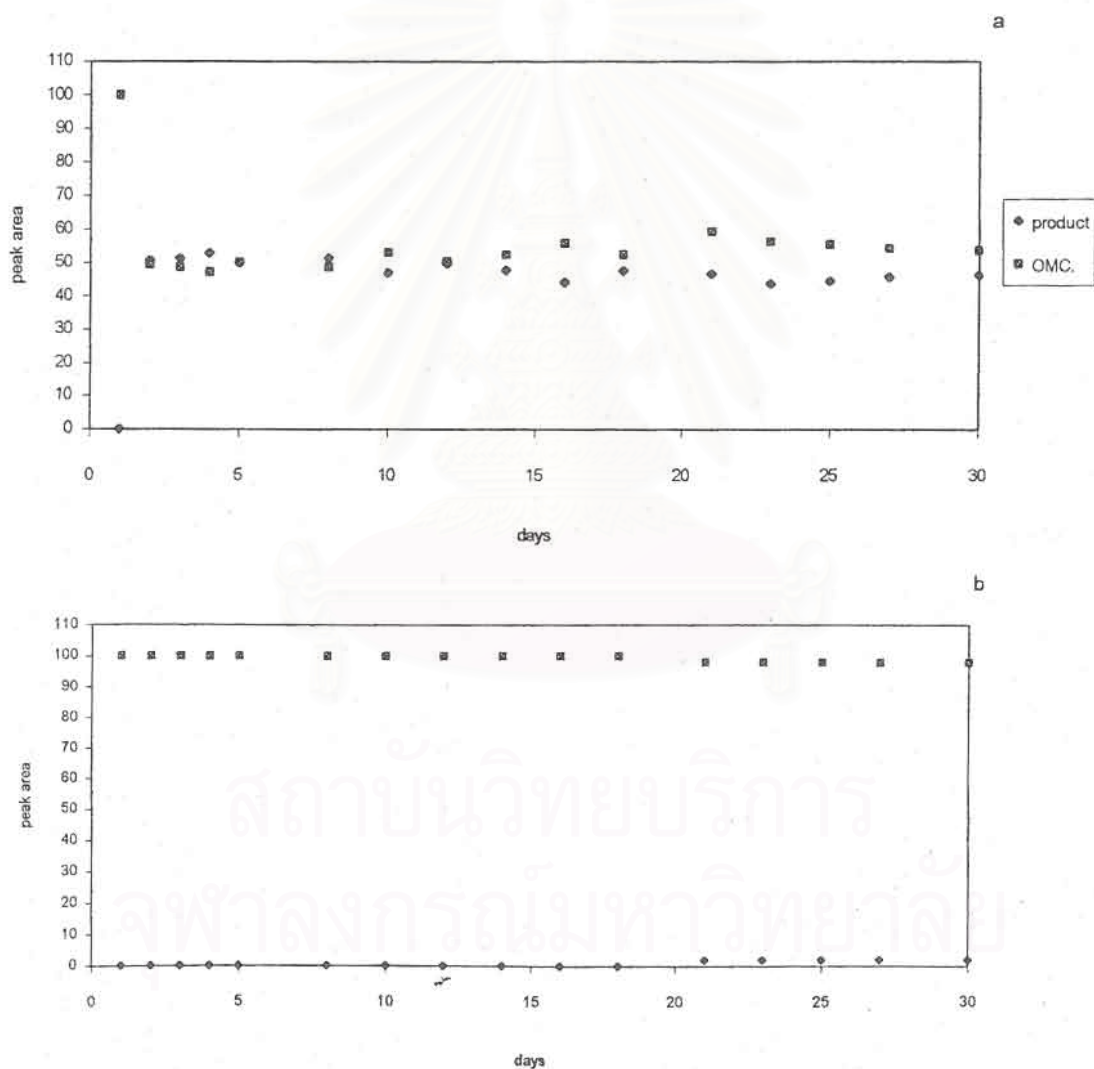


Figure 3 Degradation of OMC with (a) and without (b) light exposure. The accumulation of the degradation product and the decrease of the original OMC was represented by the changes in peak area of the peaks at retention times 3.9 and 3.6 min in the chromatograms (Fig. 2), respectively.

HPLC-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry

The HPLC-APCI-MS instrument consisted of Model 662 pump (Waters Corp.), a manual injector with a 25- μ L sample loop (Rheodyne, Cotaticca, USA), a Model 486MS variable-wavelength UV detector (Waters Corp.), a Model 600 S controller (Waters Corp.), Lichrosorb RP 18 column (particle size 5 μ m, 125 \times 8.0 mm I.D.; VDS optilap) and a VG TRIO 2000 (Fisons Instruments, Altrincham, UK) quadruple mass spectrometer equipped with APCI ionization source. The mobile phase was methanol:water (90:10 v/v) at a flowrate of 0.5 mL min⁻¹. Positive-ion mass spectra were recorded at 3.5 kV corona discharge pin voltage (cone voltage at 30 V, counter electrode voltage at 0.2 kV, and source temperature at 120 °C).

Results and discussion

Study of OMC degradation

Figure 2 shows chromatograms of standard OMC before and after light exposure. Accumulation of the degradation product can be seen by the increase in size of the new peak at retention time of around 3.6 min. To follow the degradation of the light-exposed-OMC, the standard OMC solution was put under the sunlight and withdrawn for HPLC analysis at appropriate times. Figure 3 shows the accumulation of the degradation product and the decrease of the original OMC as represented by the changes in peak area of the peaks at retention times 3.9 and 3.6 min, respectively. It is obvious that OMC is not stable under light exposure; after only one day under sunlight at room temperature about half of the compound changed into a new product. Without sunlight, no degradation of OMC was detected at room temperature (Fig. 3b). No degradation of OMC was found when the compound was kept away from light at 4, 25, 32 and 60 °C for one month.

Isolation and identification of the photo-degradation product

From the result above, it is obvious that exposing OMC to the sunlight induces the formation of the photo-degradation product. However, as can be seen in Fig. 3(a), under the conditions used, not all OMC could be changed into the degradation product. Therefore, to separate the two compounds, the

light-exposed OMC solution that contained both the original OMC and the degradation product was subjected to semi-preparative HPLC using the conditions stated in the experimental section. The result is shown in Fig. 4. It should be mentioned here that the change of mobile phase from pure methanol to methanol:water at 90:10 (V/V) was done in order to increase the resolution between the two peaks. This was to make sure that during the fraction collection of the two peaks there would be no contamination between the two compounds. Moreover, this good separation of the two peaks would prevent the cross-over effect when performing the online HPLC-APCI-MS, therefore yielding clean APCI-mass spectra of the two compounds. Collection of OMC (peak at retention time 30.9 min in Fig. 4) and the degradation product (peak at retention time 25.3 min in Fig. 4) was done and NMR spectra for each fraction were obtained. Figures 5(a-d) show ¹H NMR of standard OMC, light-exposed-OMC, isolated photo-degradation product (peak at retention time 25.3 min of the chromatogram in Fig. 4) and isolated OMC (peak at retention time 30.9 min of the chromatogram in Fig. 4). The similarity between the ¹H NMR of the isolated OMC (d) and that of standard OMC (a) confirmed that the peak at retention time of 30.9 min represented OMC of the original structure. Analysis of ¹H NMR and HMQC NMR (not shown) data, revealed a *E*-configuration for the standard OMC (Fig. 1a) and a *Z*-configuration at the same position for the isolated photo-degradation product (Fig. 1b). ¹H NMR of the light-exposed-OMC indicated the presence of only

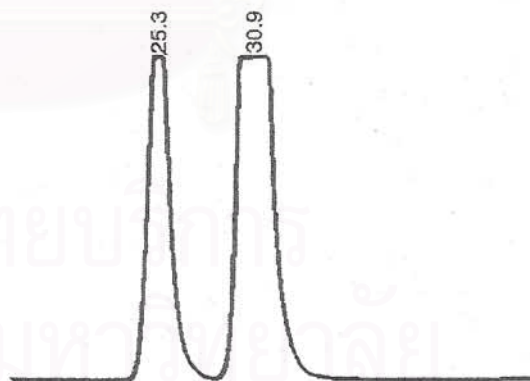


Figure 4 Chromatogram of the light-exposed-OMC solution that contained both the original OMC and the degradation product. The separation was done at 25 °C using a Lichrosorb RP 18 column. The mobile phase used was methanol:water (90:10 v/v) at the flowrate of 0.5 mL min⁻¹. The UV detector was set at 325 nm. The sample injection volume was 50 μ L.



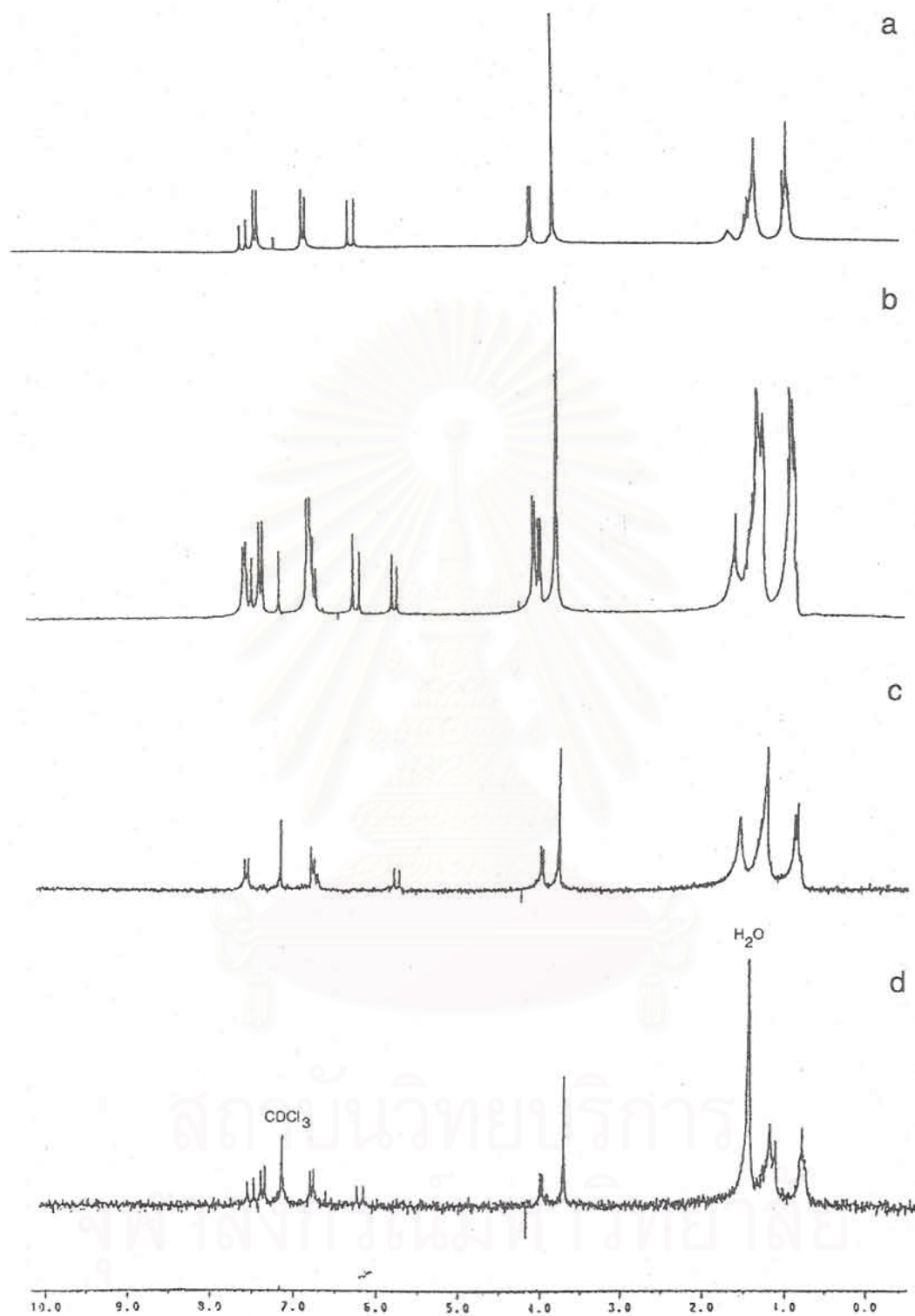


Figure 5 (a)–(d) show ^1H NMR of (a) standard OMC, (b) light exposed OMC, (c) isolated photo-degradation product (peak at retention time 49 min in Fig. 4) and (d) isolated OMC (peak at retention time 57 min in Fig. 5). All these ^1H NMR spectra were obtained from Cryomagnet NMR Spectroscopy BZH 200/52 (Spectrospin, Oxford Instruments; Bruker, Germany).

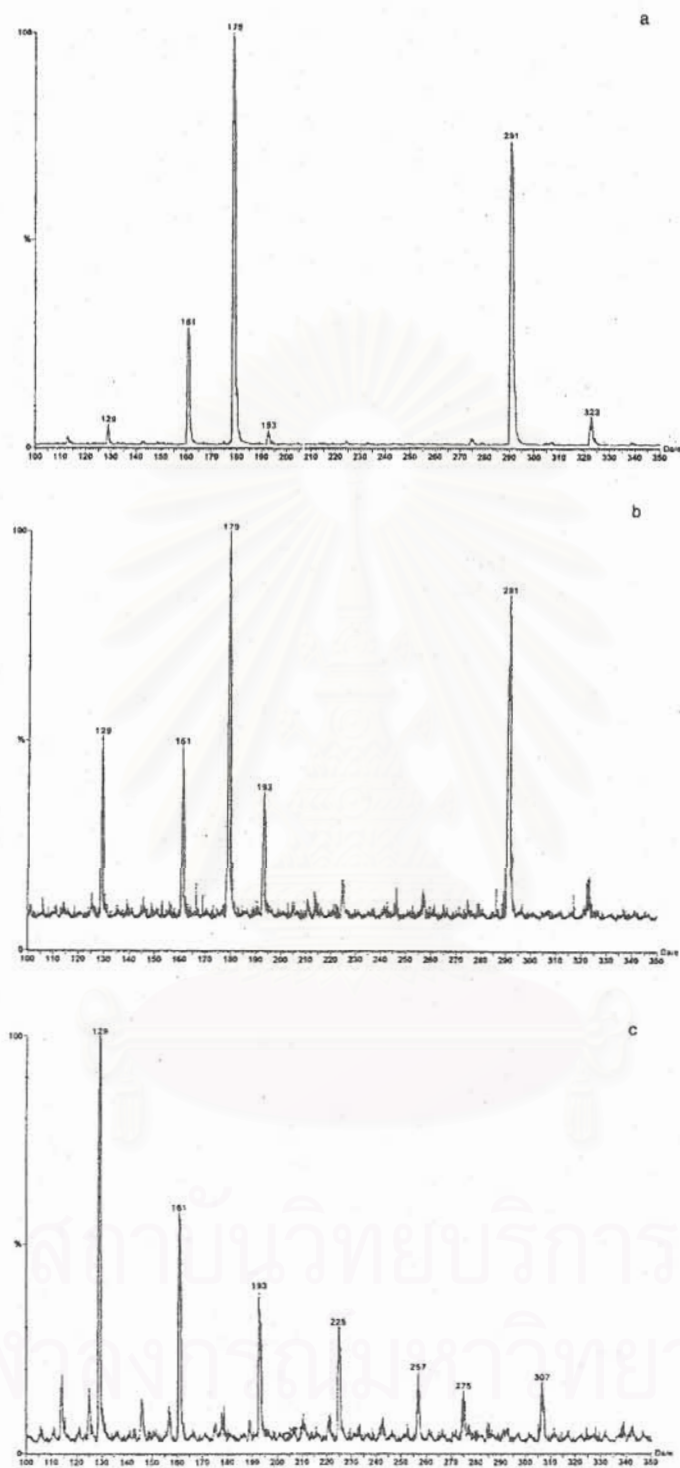


Figure 6(a, b) APCI mass spectra of the peaks from chromatogram in Fig. 4 at retention times of 30.9 and 25.3 min, respectively. (c) APCI mass spectrum of the mobile phase. The online HPLC-APCI-MS was done using Lichrosorb RP 18 column connected to the quadruple mass spectrometer equipped with APCI ionization source. Injection volume was 25 μL . The mobile phase was methanol:water (90 : 10 v/v) at a flowrate of 0.5 mL min^{-1} . Positive-ion mass spectra were recorded at 3.5 kV corona discharge pin voltage (cone voltage at 30 V, counter electrode voltage at 0.2 kV, and source temperature at 120 $^{\circ}\text{C}$).

Table I ^1H - and ^{13}C -NMR Spectral Data (from HMQC-NMR) of standard OMC (*E*-octyl-*p*-methoxycinnamate) and the isolated photo-degradation product (*Z*-octyl-*p*-methoxycinnamate)

Position	<i>E</i> -octyl- <i>p</i> -methoxycinnamate		<i>Z</i> -octyl- <i>p</i> -methoxycinnamate	
	δH	δC	δH	δC
1	3.81 (3H, s)	55.3	3.81 (3H, s)	55.3
2	—	162.1	—	161.0
3	6.87 (2H, d, $J = 7$ Hz)	114.3	6.80 (2H, d, $J = 7$ Hz)	113.3
4	7.40 (2H, d, $J = 7$ Hz)	129.7	7.66 (2H, d, $J = 7$ Hz)	132.0
5	—	127.2	—	127.2
6	7.61 (1H, d, $J = 16$ Hz)	143.1	6.80 (1H, d, $J = 12$ Hz)	144.2
7	6.29 (1H, d, $J = 16$ Hz)	115.8	5.82 (1H, d, $J = 12$ Hz)	117.5
8	—	167.5	—	167.5
9	4.09 (2H, d, $J = 6$ Hz)	66.8	4.09 (2H, d, $J = 6$ Hz)	66.7
10	1.63 (1H, br m)	38.9	1.63 (1H, br m)	38.8
11	1.34 (2H, br m)	28.9	1.34 (2H, br m)	28.9
12	0.91 (3H, br t)	14.1	0.91 (3H, br t)	14.1
13	1.36 (2H, m)	30.5	1.36 (2H, m)	30.5
14	1.41 (2H, m)	23.8	1.41 (2H, m)	23.7
15	1.34 (2H, br m)	23.0	1.34 (2H, br m)	23.0
16	0.94 (3H, t)	11.0	0.94 (3H, t)	11.0

the *E*-octyl-*p*-methoxycinnamate and the *Z*-octyl-*p*-methoxycinnamate; no other photo-degradation product was detected during the light exposure of the OMC. Although it has been known that *Z*-cinnamates can dimerize to truxillic acid derivatives [10, 11], no other peak than those belong to *E*- and *Z*-cinnamates were seen in both ^1H -NMR and HMQC NMR of the unfractionated-light-exposed-OMC. Moreover, the chromatogram of the light-exposed-OMC also showed only one new peak (*Z*-OMC). Table I shows the interpreted NMR spectral data of *E*-octyl-*p*-methoxycinnamate and *Z*-octyl-*p*-methoxycinnamate. To confirm that the two compounds were isomers, an HPLC-APCI-MS experiment of the light-exposed-OMC was done. Figure 6(a,b) shows the APCI mass spectra of peaks at retention time of 30.9 and 25.3 min (see chromatogram in Fig. 4), respectively. Both spectra gave a protonated molecular peak $[\text{CH}_3\text{O C}_6\text{H}_4 \text{CH} = \text{CH C}(\text{O}) \text{C}_8\text{H}_{18}]^+\text{H}^+$ at m/z of 291. Fragmentation at the ester bond in the ionization source gave the peak at m/z of 179, which corresponds to the protonated methoxy cinnamic acid $[\text{CH}_3\text{O C}_6\text{H}_4 \text{CH} = \text{CH C}(\text{O})\text{OH}]^+\text{H}^+$. The similarity between the two APCI-spectra confirmed that both compounds were configurational isomer. It should be mentioned here that all other peaks in the spectra correspond to the cluster ions of the mobile phase (see spectrum of the mobile phase in Fig. 6c).

References

- Kimura, K. & Katoh, T. Photoallergic contact dermatitis from the sunscreen ethylhexyl-, *p*-methoxycinnamate (Parsol MCX). *Contact Dermat.* 32, 304–305 (1995).
- Schauder, S. and Ippen, H. Contact and photocontact sensitivity to sunscreens. Review of a 15-year experience and of the literature. *Contact Dermat.* 37, 221–232 (1997).
- Jiang, R., Hayden, C.G.J., Pranker, R.J., Roberts, M.S. and Benson, H.A.E. High-performance liquid chromatographic assay for common suncreening agents in cosmetic products, bovine serum albumin solution and human plasma. *J. Chromatogr. B* 682, 137–145 (1996).
- Meijer, J. and Loden, M. Stability analysis of three UV-filters using HPLC. *J. Liq. Chromat.* 18, 1821–1832 (1995).
- Ikeda, K., Suzuki, S. and Watanabe, Y. Determination of sunscreen agents in cosmetic products by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Chromatography*, 21, 240–245 (1989).
- Tarras-Wahlberg, N., Stenhagen, G., Larko, O., Rosen, A., Wennberg, A.M. and Wennerstrom, O. Changes in ultraviolet absorption of sunscreens after ultraviolet irradiation. *J. Invest. Dermatol.* 113, 548–553 (1999).
- Hocking, M.B. Photochemical and thermal isomerizations of *cis*- and *trans*-cinnamic acids, and their photo-stationary state. *Can. J. Chem.* 47, 4567–4576 (1969).
- Ishigami, T.K., Nakasato, M.V. and Endo, T. Marked dependence of multiplicity in direct *Z*, *E* photoisomerization of a series of methylcinnamates on their para-substituents. *Tetrahedron Lett.* 10, 863–865 (1979).

9. Morliere, P., Avice, O., Melo, T.S.E., Dubertret, L., Giraud, M. and Santus, R. A study of the photochemical properties of some cinnamate sunscreens by steady state and laser flash photolysis. *Photochem. Photobiol.* **36**, 395–399 (1982).
10. Ito, Y., Borecka, B., Trotter, J. and Scheffer, J.R. Control of solid-state photodimerization of *trans*-cinnamic acid by double salt formation with diamines. *Tetrahedron Lett.* **36**, 6083–6086 (1995).
11. Nakamura, T., Takagi, K., Itoh, M., Fujita, K., Katsu, H., Imae, T. and Sawaki, Y. Photodimerization of cinnamic acids controlled by molecular assemblies of surfactant amine N-oxides. *J. Chem. Society-Perkin Trans 2*, 2751–2755 (1997).



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย