

短報

化粧品中のクロルクレゾールの
 高速液体クロマトグラフィー
 による分析

松阪 綾子¹, 佐々木 加代²,
 佐藤 信夫², 土井 佳代¹

The Analytical Methods for
 Chlorocresol
 Determination in Cosmetics with
 High Performance Liquid
 Chromatography

Ayako MATSUZAKA, Kayo SASAKI,
 Nobuo SATO and Kayo DOI

はじめに

クロルクレゾール (4-Chloro-3-methylphenol, CC) は、平成12年9月に告示された化粧品基準¹⁾において、全ての化粧品100g中の最大配合量が0.5g以下と配合に制限があり、その分析法として、薬剤中のCC量の高速液体クロマトグラフ (HPLC) 蛍光検出法²⁾が報告されている。しかし、蛍光検出器を用いる方法は誘導体化処理が必要である。そこで、紫外吸光光度計 (UV 検出器) を用い、化粧水及び乳液中のCCの定量方法についてHPLCによる分析条件の検討を行い、良好な結果が得られたので報告する。

方 法

(1) 試薬及び標準溶液の調製

CCの異性体である、5-クロロ-2-メチルフェノール (5C2MP) は東京化成試薬特級、2-クロロ-5-メチルフェノール (2C5MP) は和光純薬試薬一級、4-クロロ-2-メチルフェノール (4C2MP) は和光純薬化学用試薬を用い、その他の試薬は全て和光純薬試薬特級品を用いた。標準品として用いたCCの純度は、HPLCによる不純物ピーク含量比による、CCのピーク保持時間の6倍測定で99.0%以上であった。

CC約0.01gを精密に量り取り、メタノール/水混液 (60:40) で正確に100mLとし、0.05w/w%配合用の標準溶液とした。また、CC約0.1gを精密に量り取り、メタノール/水混液 (60:40) で正確に100mLとし、0.5w/w%配合用の標準溶液とした。なお、定量範囲を確認するための試験は、6段階に希釈した1μg/mL~2mg/mLの各標準溶液について、注入量8~12μLで測定した。

(2) 試料

試験に供した試作品である化粧水及び乳液は、表1に示した配合成分及び配合量で調製した、CC無配合、0.05w/w%CC配合及び0.5w/w%CC配合品を用いた。

表1 試験に用いた化粧水及び乳液の処方

成 分	化 粧 水		
	0.05w/w%CC	0.5w/w%CC	無 配 合
水	78.2	73.25	78.25
エタノール95%	15.0	15.0	15.0
濃グリセリン	3.0	3.0	3.0
ジプロピレングリコール	3.0	3.0	3.0
ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油	0.5	5.0	0.5
クエン酸	0.02	0.02	0.02
クエン酸ナトリウム	0.08	0.08	0.08
メチルパラベン	0.15	0.15	0.15
クロルクレゾール	0.05	0.5	—

成 分	乳 液		
	0.05w/w%CC	0.5w/w%CC	無 配 合
水	77.345	76.895	77.395
エデト酸三ナトリウム	0.01	0.01	0.01
濃グリセリン	5	5	5
1,3-ブチレングリコール	7	7	7
メチルパラベン	0.15	0.15	0.15
カルボキシビニルポリマー	0.1	0.1	0.1
水酸化カリウム	0.045	0.045	0.045
イソステアリン酸ポリオキシエチレングリセリル	1.2	1.2	1.2
モノステアリン酸ポリオキシエチレングリセリン	0.8	0.8	0.8
ベヘニルアルコール	0.2	0.2	0.2
パチルアルコール	0.1	0.1	0.1
スクワラン	3.5	3.5	3.5
テトラ2-エチルヘキサン酸ペンタエリスリット	4.5	4.5	4.5
クロルクレゾール	0.05	0.5	—

(3) HPLCによる分析条件の検討

HPLCはアジレント製1100シリーズ (クォータナリーポンプ, カラムオープン, オンラインデガッサー, オートサンプラー) を用いた。

CCには3種類の異性体があることから、それらの保持時間について、カラムはUnison US-C18 4.6mm i.d.x150mm (5μm, インタクト製) を用い、移動相はメタノール/水混液の混合比率を55:45, 60:40及び65:35で検討を行った。

また、化粧品には、パラオキシ安息香酸エステル類 (パラベン類) 及びフェノキシエタノール (PE) が防腐剤として繁用されていることから、CCとパラベン類であるメチルパラベン (MP), エチルパラベン (EP), イソプロピルパラベン (IPP), プロピルパラベン (PP), イソブチルパラベン (IBP), ブチルパラベン (BP) 及びPE

1 神奈川県衛生研究所 理化学部
 〒253-0087 茅ヶ崎市下町屋1-3-1
 2 (株) コーサー研究本部

の保持時間について、カラムは Unison US-C18 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, インタクト製), Inertsil ODS-3 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, GL サイエンス製), TSKgel ODS-80Ts 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, 東ソー製) 及び Inertsil ODS-3 4.6mm i.d.x150mm (3 μ m, GL サイエンス製) を用い、移動相はメタノール/水混液 (60 : 40) を用いて検討を行った。

なお、メタノール/水混液を移動相に用いた場合、カラムの背圧が上昇することから、移動相として pH2.5 に調整した 20mmol/L NaH₂PO₄/アセトニトリル混液 (1 : 1) を用い、カラムに Capcellpak C18 MG 4.6mm i.d.x250mm (5 μ m, 資生堂ファインケミカル製) を用いた検討も併せて行った。

(4) 標準品の添加回収の検討

前出の HPLC 装置を用い、カラムは Unison US-C18 4.6mm i.d.x150mm (5 μ m, インタクト製) を用いた。移動相にはメタノール/水混液 (60 : 40) を流量 1mL/min で流し、注入量は 10 μ L とし、UV 検出器 (測定波長 227nm) を用いた。

CC 無配合化粧品を試料とし、試料約 1g を精密に量り取り、これに 0.05w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、メタノール/水混液 (60 : 40) で正確に 50mL とする。また、0.5w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、同様の操作を行い、これらの溶液を孔径 0.45 μ m、口径 13mm のメンブランフィルター 1 (DISMIC-13HP, アドバンテック製) によりろ過し、最初のろ液を 2mL 捨て、次のろ液を試料溶液とした。次に、CC 無配合乳液を試料とし、試料約 1g を精密に量り取り、0.05w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、メタノール/水混液 (60 : 40) 及びエタノールを 30mL 程度加え、超音波に 5分間かけて分散し、室温になるまで放冷後、メタノール/水混液 (60 : 40) 及びエタノールで正確に 50mL とする。また、0.5w/w% 配合用標準溶液を正確に 5mL 添加し、同様の操作を行い、これらの溶液を孔径 0.45 μ m、口径 25mm のメンブランフィルター 2 (GHP アクロディスク GF, ゲルマン製) によりろ過し、最初のろ液を 2mL 捨て、次のろ液を試料溶液とした。

(5) 試料溶液の調製及び定量

化粧品は試料約 1g を精密に量り取り、メタノール/水混液 (60 : 40) で正確に 50mL とする。この液をメンブランフィルター 1 によりろ過し、最初のろ液 2mL を捨て、次のろ液を試料溶液とした。乳液については試料約 1g を精密に量り取り、メタノール/水混液 (60 : 40) 及びエタノールを 30mL 程度加え、超音波に 5分間かけて分散し、室温になるまで放冷後、メタノール/水混液 (60 : 40) 及びエタノールで正確に 50mL とした溶液をメン

ブランフィルター 2 によりろ過し、最初のろ液 2mL を捨て、次のろ液を試料溶液とした。

結果および考察

(1) HPLC 測定条件

CC には 3種類の異性体があり、これらの異性体が標準品に不純物として混入する可能性が考えられるため、保持時間について ODS 系カラムを用い、移動相の違いについて検討を行った。その結果、移動相にメタノール/水混液 (60 : 40) を用いたところ、3種類の異性体について分離度は各々 2.3 以上が得られた。なお、4C2MP 及び 5C2MP の保持時間が接近しているため、この 2成分は分離されなかったが、CC との分離には支障はなかった (図 1)。しかし、アセトニトリル系を移動相に用いた場合、今回の条件では異性体の 1つである 2C5MP と CC のピークが一部重なり、分離はよくなかった。これらの結果から、今回検討した条件では CC とその異性体の分離には、移動相としてメタノール/水混液が適切であると考えられた。

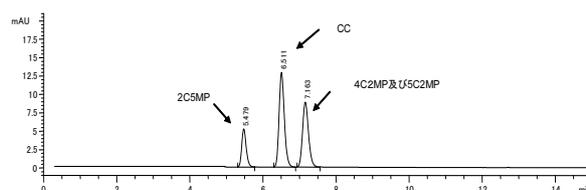


図 1 CC 及びその異性体のクロマトグラム

(2) CC 及びパラベン類及び PE における検討

CC とパラベン類及び PE について保持時間を確認したところ、MP, PE, EP, IPP, PP, CC, IBP, BP の順にピークは現れ、CC 及び PP の保持時間が接近していた。このことから粒径 5 μ m、長さ 150mm のメーカーの異なる 3種類の ODS 系カラムを用いたが、いずれも分離度 1.5 以上は得られなかった。そこで粒径 3 μ m、長さ 150mm の ODS 系カラムを用いたところ、分離度 2.5 と良好な結果を得た。また、粒径は 5 μ m であるが、長さ 250mm の ODS 系カラムを用いたところ、分離度 2.3 と良好な結果を得た。これらの結果から、PP を含有する化粧品では、粒径 5 μ m、長さ 150mm の ODS 系カラムを用いる場合は、理論段数を大きくするため、細かい粒径のものを選択するか、保持時間は長くなるが、長さ 250mm の ODS 系カラムを選択することが可能であると考えられた。

(3) 検量線の作成

CC の定量下限値を S/N 比 10 以上で求めた結果 42ng 以上であったため、50ng ~ 1.2 μ g の範囲で CC のピーク面積と CC 量 (ng) より検量線を作成した結果、相関係

数0.999以上で直線性が認められた。3回検量線を作成した結果、傾き 2.829 ± 0.013 , Y切片 -0.8207 ± 1.427 と良好な結果を得た。なお、定量には $Y = 2.829X - 0.8207$ の回帰式を用いた。

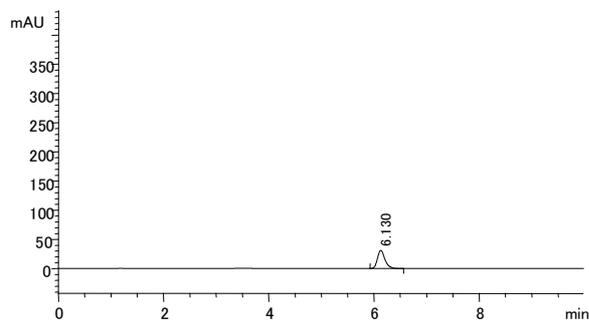
(4) 試料溶液の調製方法の検討

化粧水はメタノール/水混液 (60 : 40) により澄明に溶解したことから、試料約1gを精密に量り取り、メタノール/水混液 (60 : 40) で正確に50mLとし、試料溶液としたところ、添加回収試験において99%以上の回収

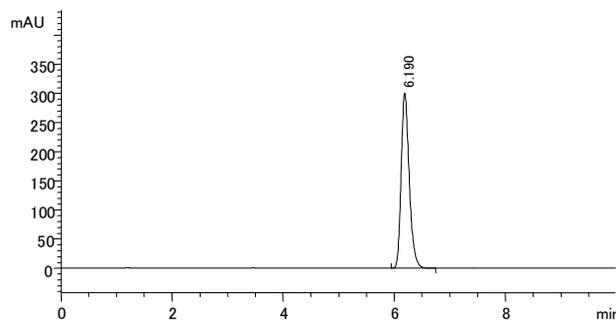
率が得られ、変動係数も0.5%以下であった。このことから、化粧水に対する本抽出条件は適切であると考えられた。乳液はメタノール/水混液 (60 : 40) では白濁状態で分散し、抽出効率に影響が出ることが考えられたので、抽出をエタノールにしたところ、メタノール/水混液 (60 : 40) ほど白濁せず、容易に分散した。そこで、メタノール/水混液 (60 : 40) 及びエタノールによる2種類の抽出方法について試験を行った。この結果、添加回収試験においてメタノール/水混液及びエタノールによ

表2 各試料の定量試験結果

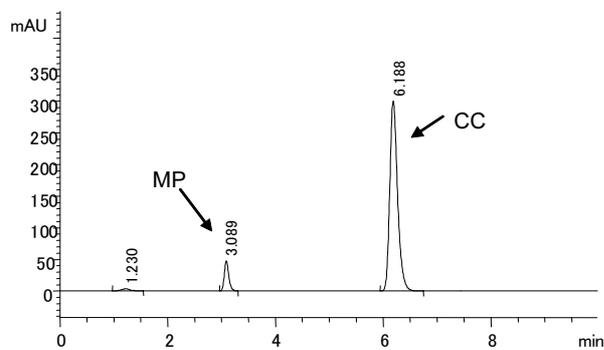
試料	化粧水		乳液			
	メタノール/水混液(60:40)抽出		メタノール/水混液(60:40)抽出		エタノール抽出	
	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合	0.05%CC 配合	0.5%CC 配合
平均値 ^a (%)	0.0477	0.4847	0.0501	0.4975	0.0502	0.4978
S.D.	0.0005	0.0049	0.0006	0.0069	0.0008	0.0031
CV値	1.0482	1.0109	1.1970	1.3869	1.5936	0.6227



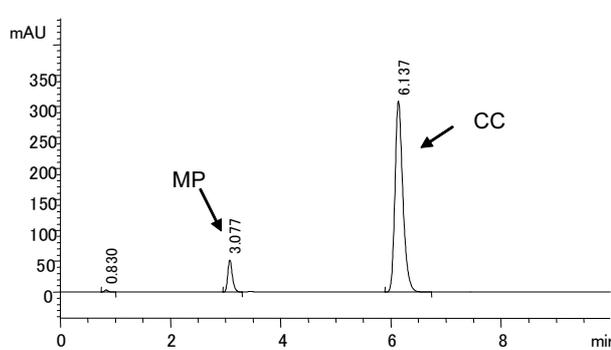
クロルクレゾール標準液(0.1 μg)



クロルクレゾール標準液(1.0 μg)



0.5%クロルクレゾール配合化粧水



0.5%クロルクレゾール配合乳液

図2 クロルクレゾール標準品及び化粧品のクロマトグラム

る抽出とともに99%以上の回収率であった。このことから、抽出時の試料溶液の白濁はCCの回収率にはほとんど影響しないことがわかった。しかしながら、試料の均一性の点から、乳液の抽出では、より澄明なる抽出液を選択することが望ましいと考えられた。なお、メンブランフィルターへの吸着の有無をみた結果、CC標準液については最初のろ液1mLからCC量に変動を認めなかった。試料溶液では最初のろ液1mLでは、CC量の低いものが認められたが、1mLあるいは2mLを捨てれば吸着は無視できることがわかった。

(5) 試料の定量

表1に示した試作品の化粧水、乳液について定量を行った結果、表2の通り、配合量とほぼ一致する結果が得られた。また、各試料につき、6回繰り返し試験を行い、再現性を確認したところ、良好な結果を得た。

本条件におけるCCの定性下限値をS/N比3.3以上で求めた結果14ng、定量下限値をS/N比10以上で求めた結果42ng以上であった。本条件によるCCの理論段数は9400以上、シンメトリー係数は1.3であった。また、標準液0.1 μ g及び1.0 μ g相当量の6回繰り返し注入によるピーク面積の変動係数は0.5%以下であった。なお、試料として用いた化粧水及び乳液には防腐剤であるMPが含まれていたが、図2に示す通り、MPとCCを良好に

分離することができた。

これらのことから、本法はCCの定量法として使用できるものと考えられた。

ま と め

化粧品に防腐剤等として配合されるCCの定量方法として、ODS系カラム、移動相としてメタノール/水混液(60:40)、UV検出器(測定波長227nm)を用い、試料溶液の調製は、化粧水はメタノール/水混液(60:40)、乳液はメタノール/水混液(60:40)またはエタノールで抽出することにより、添加回収試験において99.0%以上の回収率が得られ、試料の定量は配合量にほぼ一致する結果が得られた。

(平成16年7月28日受理)

文 献

- 1) 厚生省告示第330号及び厚生省告示第331号、平成12年9月
- 2) Gatti R., Roveri P., Bonazzi D. and Cavrini V.: HP LC-fluorescence determination of chlorocresol and chloroxyleneol in pharmaceuticals, J. Pharm. Biomed. Anal., 16, pp.405-412 (1997)