

短報

フォトダイオードアレイ検出 高速液体クロマトグラフィーを 用いた化粧品に配合される 防腐剤の一斉分析法の検討

羽田千香子, 熊坂謙一, 宮澤眞紀

Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by high-performance liquid chromatography/photodiode array detection

Chikako HADA, Kenichi KUMASAKA
and Maki MIYAZAWA

緒言

化粧品には微生物の発育を抑制することを目的に防腐剤が配合されており、配合できる成分や量については、薬事法上の化粧品基準¹⁾の別表第3において、詳細な規制が示されている。また、東京都の調査では、分析対象としたほとんどの製品に防腐剤が配合されていることが報告されている²⁾。このため、化粧品製造の適切な品質管理及び監視の観点から、製品中の防腐剤成分の分析方法が必要であるが、化粧品基準にはその方法は示されていない。実際の分析においては衛生試験法・注解2010³⁾や森らの報告²⁾に記載されている方法などが参考になるが、当該方法では、移動相の調製方法が煩雑な上、イオンペア試薬を使用しているため、平衡化に時間がかかるという問題点がある。

そこで、移動相条件の改良、有機溶媒の使用量の削減を念頭にした新たな防腐剤13成分（サリチル酸（SA）、安息香酸（BA）、ソルビン酸（SO）、デヒドロ酢酸（DA）、フェノキシエタノール（PE）、メチルパラベン（MP）、クロルフェネシン（CP）、エチルパラベン（EP）、イソプロピルパラベン（IP）、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）、イソプロピルメチルフェノール（IM））を対象とした一斉分析が可能なスクリーニング法を検討し、有用な結果を得たので報告する。

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

方法

1. 試薬

防腐剤の標準品として、PE, MP, EP, BP, SA, BA, DA及びSOは和光純薬工業（株）製の和光特級を用いた。IP（98%）、IBP（98%）は和光純薬工業（株）より購入した。CPはAlfa Aesar 製（99%）、PPは東京化成工業製（99%、等級:GR）、IMはAldrich製（99%）を用いた。移動相として使用するメタノール、アセトニトリル及び酢酸は和光純薬工業（株）製のHPLC用を用い、塩化セチルトリメチルアンモニウムはAcross製（99%）を使用し、その他の試薬等は市販の特級品を用いた。

2. 装置及び器具

本分析には、Waters製 Alliance 2695 Separation Moduleに2996フォトダイオードアレイ（PDA）検出器を接続したHPLCシステムを用いた。なお、PDA検出器の測定範囲は210~400 nmとし、検出波長は220 nmとした。分析カラムは関東化学社製Mightysil RP-18GP（粒径3 μ m, 3.0 mm ϕ ×150 mm）を用い、カラム温度は40 $^{\circ}$ C、移動相はA混液（水/アセトニトリル/0.25 mol/l酢酸アンモニウム溶液/酢酸混液（350 : 50 : 100 : 1））とB混液（水/アセトニトリル/0.25 mol/l酢酸アンモニウム溶液/酢酸混液（50 : 350 : 100 : 1））を用いて、グラジエント送液とした。その送液条件は、流量0.4 ml/min でA混液/B混液混合比率95:5を初期条件として3分間保持した後、30分間で混合比率15:85まで直線的に変化させた。注入量は5 μ lとした。

メンブランフィルターはPALL社製 GHP Acrodisc（孔径0.45 μ m, 直径25 mm）を用いた。

3. 標準溶液調製

各標準品約0.05 gを精密に量り、メタノールを用いて溶解及び希釈し、5 mg/mlの標準原液とした。各標準原液を用い、直線性範囲の確認用として、2.5, 5, 10, 50, 125及び250 μ g/mlの混合標準溶液を調製した。また、添加回収試験及び実製品への適用では、検量線作成のため、5, 10, 50, 75及び125 μ g/mlの混合標準溶液を使用した。また、検出限界及び定量限界確認用としては、1, 2, 3, 4及び5 μ g/mlの混合標準溶液を調製した。

4. 直線性、検出限界及び定量限界

直線性は、3. 標準溶液調製にて調製した直線性確認用混合標準溶液について各濃度を3回繰り返し注入し、成分濃度とクロマトグラム上のピーク面積値との回帰直線の相関係数及びバイアスから直線性の範囲を評価した。また、検出限界及び定量限界はその確認用標準溶液について、各濃度を3回繰り返し注入し、成分濃度とクロマトグラム上のピーク面積値との直線の傾き（slope）及

び残差の標準偏差 (σ) より以下の計算式により算出した。

$$\text{検出限界} = 3.3 \sigma / \text{slope}$$

$$\text{定量限界} = 10 \sigma / \text{slope}$$

5. 試料溶液調製

森らの報告²⁾及び沢辺, 川口の報告⁴⁾に準じ, 試料をメタノールに分散・溶解させて試料溶液を調製した。即ち, 試料約0.4 gを首太メスフラスコに精密に採取し, メタノールを10 ml加え, 10分間超音波処理して分散又は溶解し, 冷却後, メタノールで正確に20 mlとした後, 遠心分離し上澄液を得た。この液をフィルターでろ過し, 試料溶液とした。

6. 添加回収試験

各防腐剤成分の表示がなく, あらかじめ防腐剤13成分が不含であることを確認した化粧水, シャンプーを用い, 混合標準溶液を添加し, その回収率を求めた。添加量は化粧品中の配合量として0.5, 2.5, 5.0 mg/gとなるように添加し, 併行精度(日内精度)及び室内再現精度における繰り返し回数は各々6回とした。

なお, 試料溶液の調製法は, 5. 試料溶液調製に示した方法で行い, メタノールを10 ml加える代わりに, 100 μ g/mlの混合標準溶液2 ml, 250 μ g/mlの混合標準溶液を4 ml, 8 ml 添加し, 混合標準溶液と合わせて10 mlとなるようメタノールを添加した。

7. 実製品への適用

SA, BA, PE, MP, PPを含む化粧水, シャンプー等の9製品について, 5. 試料溶液調製と同様に調製し, 検

出成分と製品の表示成分との一致を確認し, 本法で分析した定量値と衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件で分析した定量値を比較した。

結果及び考察

1. 分析条件の検討

本検討においては衛生試験法・注解2010³⁾を対象としている10成分に加え, 当所における過去の分析事例及び森らの報告²⁾から検出事例の多いPE⁵⁾, CP⁶⁾, IMを追加した防腐剤13成分を分析対象成分とした。

分析条件の検討を行うにあたり, カラム内径のサイズを汎用的な4.6 mmから3.0 mmに変更した。これにより, 変更前と同等の線速度を保持して分析を行う場合, 移動相の使用量が約60%削減され, アセトニトリル等の使用量を削減することが可能となった。

また, 適当な移動相条件の検討を行うため, 100 μ g/mlの混合標準溶液を用いた。当初, 移動相の調製が簡便である0.1%リン酸水溶液や0.1%ギ酸水溶液とアセトニトリルによる複数のグラジエント条件で検討を行ったが, 対象成分全てを分離することは困難であった。そこで今後の液体クロマトグラフ質量分析法(LC/MS)への展開を視野に入れ, 衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件がpH5.2であることから, pKaが近い酢酸アンモニウムに酢酸を添加した移動相を用いることとした。これにより分離状況は改善されたが, グラジエント送液による酢酸アンモニウム緩衝液の濃度変化の影響がベースラインのドリフトに顕著に現れたため, グ

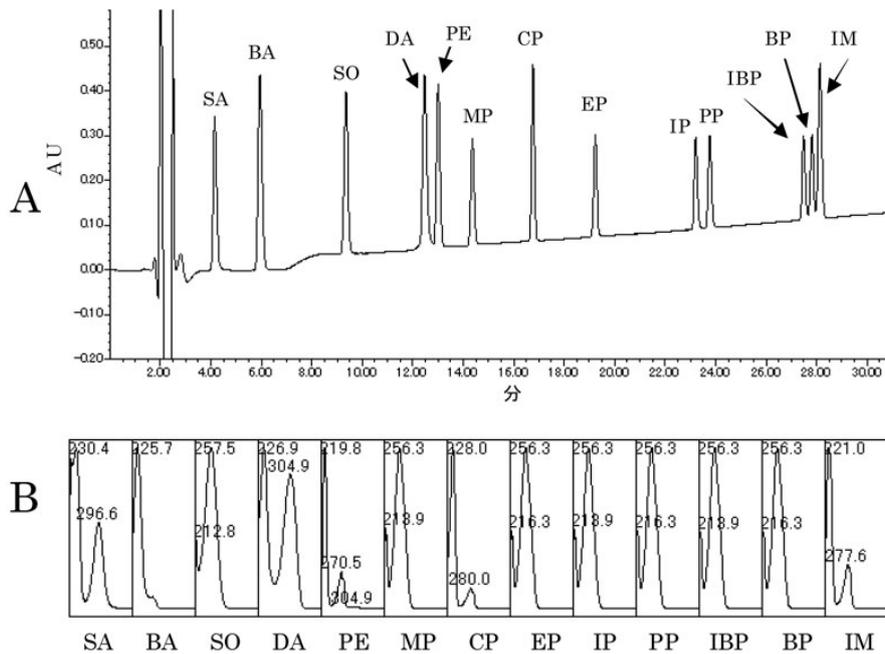


図1 防腐剤13成分のクロマトグラム (A) 及び各成分ピークのUV吸収スペクトル (B)

ラジエント送液により有機溶媒の比率にのみ変化を与え、酢酸アンモニウム緩衝液の濃度に変動がない移動相条件に変更し、最終的な移動相条件を確立した。本移動相条件における100 $\mu\text{g/ml}$ 混合標準溶液のクロマトグラムを図1 (A) に示す。IBPとBPの保持時間の分離度は1.4であったが、13成分について概ね良好に分離した。

分析対象とした各成分ピークの紫外 (UV) 吸収スペクトルを図1 (B) に示す。パラベン類は極大吸収波長256 nmを持つ特徴的なUV吸収スペクトルを示したほか、他の成分でも特徴的なUV吸収スペクトルを示した。そのため、各ピークの保持時間に加えてそのUV吸収スペクトルを確認することは成分確認に有用であると考えられる。なお、本分析条件におけるPDA検出器の検出波長は、スクリーニングを目的としているため、全成分を同時に感度良く検出できる波長である220 nmを使用した。

2. 直線性範囲, 検出限界及び定量限界

混合標準溶液を用いて分析を行ったところ、直線性範囲, 回帰式, 相関係数及び定量限界は表1の通りであり, 各成分とも相関係数0.999以上の良好な直線性が見られた。なお, 検出限界は計算上は, 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下であったが, 各成分のピークUV吸収スペクトルが明瞭に確認できる濃度として1 $\mu\text{g/ml}$ とした。

3. 添加回収試験

化粧水, シャンプーに3段階の濃度の混合標準溶液を

表1 混合標準溶液による直線性の範囲

成分	直線性範囲	回帰式	相関係数	定量限界
	$\mu\text{g/ml}$			$\mu\text{g/ml}$
SA	5~125	$y = 31818x - 14991$	0.9999	1.8
BA	5~125	$y = 31818x - 14991$	0.9999	0.8
SO	2.5~125	$y = 37471x + 8410.4$	0.9999	1.9
DA	5~125	$y = 45032x - 64664$	0.9998	2.5
PE	5~125	$y = 34342x + 25790$	0.9999	2.1
MP	5~250	$y = 21054x + 7974.5$	0.9999	2.4
CP	2.5~125	$y = 28994x + 4734.1$	0.9999	1.1
EP	5~250	$y = 19270x + 7923.1$	0.9999	2.1
IP	5~250	$y = 17133x + 5374.3$	0.9999	2.7
PP	5~250	$y = 17562x + 11441$	0.9999	2.2
IBP	5~250	$y = 16102x + 9244.5$	0.9999	1.8
BP	5~250	$y = 16198x + 14889$	1.0000	2.3
IM	2.5~125	$y = 31677x + 12246$	0.9999	1.6

添加して実施した併行精度及び室内再現精度の結果を, それぞれ表2, 表3に示す。また, 添加量2.5 mg/gにおけるクロマトグラムを図2に示す。回収率については概ね良好な値を示したが, 併行精度のIBPにおいて, シャンプーにおける添加量0.5 mg/gでは, 108.2%とやや高い回収率であった。本来, 定量においては夾雑成分の影響を考慮して, より長波長側の各成分の極大吸収波長を用いることが望ましいが, 全成分を良好に検出できる220 nmは夾雑成分も検出されやすく, 移動相のグラジエント送液によるベースライン変動の影響を受けやすいため, 回収率に影響が現れたと考えられる。確認のため, 測定波長をIBPの極大吸収波長である256 nmで解析し

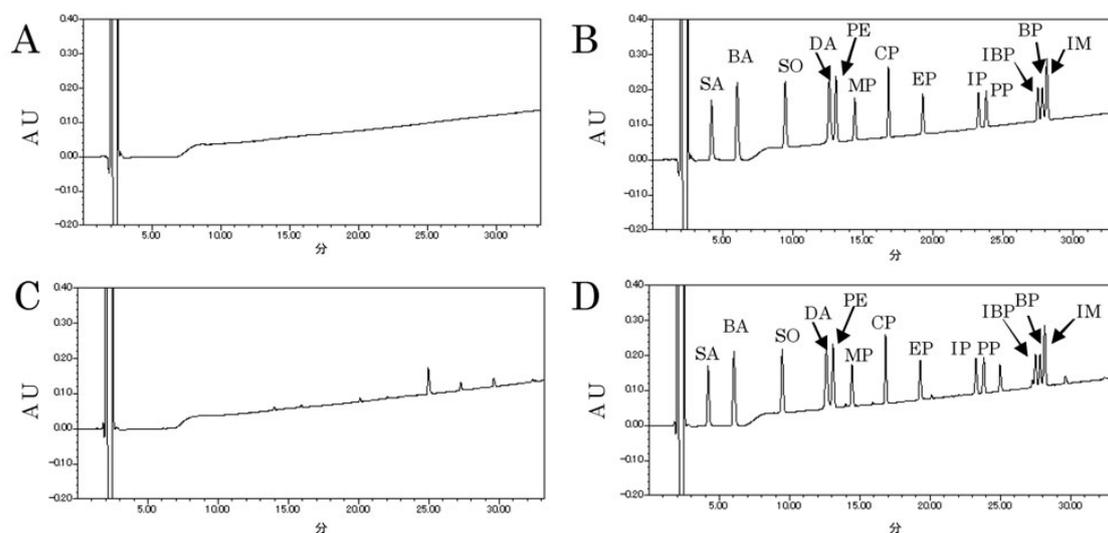


図2 添加回収試験におけるクロマトグラム

(A) 未添加化粧水試料, (B) 添加化粧水試料, 添加濃度 2.5 mg/g,
(C) 未添加シャンプー試料, (D) 添加シャンプー試料, 添加濃度 2.5 mg/g

表 2 防腐剤成分の添加回収試験の併行精度

成分	化粧品			シャンプー		
	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g
SA	100.4±5.7	100.2±1.3	101.3±2.9	102.7±4.3	102.6±2.3	101.0±1.4
BA	100.2±2.4	101.2±1.5	101.8±3.0	100.6±1.8	102.6±2.2	101.3±1.3
SO	101.6±3.7	102.0±1.1	102.0±3.4	101.9±4.1	104.4±2.4	101.3±1.4
DA	97.2±4.2	101.3±1.6	102.5±3.2	101.5±2.8	103.0±2.1	102.1±1.7
PE	94.9±1.9	102.5±1.8	102.5±2.7	96.7±4.3	104.1±2.3	101.7±1.4
MP	98.6±5.1	101.4±1.9	101.6±2.8	105.9±4.4	103.3±1.9	101.6±1.4
CP	98.2±4.0	102.5±1.3	101.9±2.8	101.3±2.7	103.6±1.8	101.8±1.6
EP	102.3±3.4	102.0±1.7	101.9±2.7	102.2±5.0	103.1±3.0	101.2±1.8
IP	101.0±5.3	100.5±1.7	100.5±3.0	99.4±6.0	102.6±2.0	100.9±1.6
PP	102.4±5.4	101.5±1.3	101.5±2.7	100.4±3.3	102.8±2.4	101.2±1.4
IBP	98.2±3.4	101.8±1.7	102.3±2.9	108.2±4.8	105.7±2.5	103.2±1.9
BP	97.8±1.9	101.2±1.8	101.4±2.6	99.5±2.1	102.7±1.6	100.7±1.6
IM	96.7±2.5	101.7±1.7	102.3±2.9	97.3±2.1	103.3±2.0	101.9±1.7

平均(%)±標準偏差, n=6

表 3 防腐剤成分の添加回収試験の室内再現精度

成分	化粧品			シャンプー		
	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g
SA	94.3±7.2	100.8±2.2	100.2±1.7	97.1±7.3	100.4±1.4	99.7±0.9
BA	97.7±4.3	101.8±1.8	100.7±1.5	98.2±4.8	100.9±1.1	99.9±1.2
SO	96.6±4.9	102.6±2.4	100.5±1.5	98.7±6.5	101.5±1.3	99.8±0.8
DA	98.1±4.8	100.8±1.8	100.6±1.3	97.2±2.6	100.5±1.7	99.6±1.5
PE	95.8±4.4	102.4±1.7	100.8±1.7	93.3±5.4	101.8±1.5	99.9±1.2
MP	96.0±7.6	102.1±2.1	100.4±1.5	98.7±6.8	100.8±1.3	100.0±0.9
CP	94.0±5.2	102.4±1.6	100.8±1.5	96.1±4.3	101.9±2.0	100.0±1.3
EP	99.6±1.9	102.8±2.6	100.1±1.5	101.6±1.2	101.3±1.7	99.6±0.6
IP	98.5±6.8	102.2±2.0	100.6±1.5	99.0±4.6	101.6±0.8	100.4±1.3
PP	94.0±4.6	102.0±0.8	100.6±1.4	97.2±4.0	100.8±1.0	100.2±1.5
IBP	96.9±5.5	101.6±2.3	100.8±1.7	102.7±6.0	103.0±1.5	101.0±1.2
BP	99.7±1.8	102.9±2.7	100.1±1.6	101.8±1.0	101.3±1.8	99.7±0.7
IM	95.3±5.6	102.0±2.3	100.7±1.7	98.3±5.3	101.8±0.9	100.2±1.1

平均(%)±標準偏差, n=6

たところ、その回収率は101.4%と良好であった。また、両サンプルにおいて、添加濃度0.5 mg/gについては他の結果に比べてばらつきが大きい、グラジエント送液を用いたスクリーニング法であることから、問題のないレベルであると考えられた。

4. 試料への適用

市販化粧品9品目を対象に分析を実施した。本分析条件において防腐剤13成分のピークに対して夾雑成分ピークの影響は見られなかった。また、検出された防腐剤成分は各製品の表示成分と一致していた。さらにその定量値は衛生試験法・注解2010³⁾に記載されている移動相条件で定量した値とほぼ同等の定量値を示した(表4)。以上の結果より、移動相にイオンペア試薬を用いずとも、移動相のpHを適切に調整すれば防腐剤13成分の一斉分析が可能であると考えられた。また、今回検討した移動相であれば、定性・定量性により優れたLC/MS法への

発展が可能であると考えられる。

一方、化粧品には、基材として各種油分、保湿剤、界面活性剤等が含まれており⁷⁾、質量分析法で分析する場合、これらの成分は除去、精製しなければならぬ。さらに、植物エキス等を含む化粧品が増えている状況であるため、天然成分由来の夾雑成分の影響を低減する必要も高まることから、Mikamiらの報告⁸⁾にもある通り、今後はさらに、固相抽出カートリッジ等によるクリーンアップについても検討していく必要があると思われる。

結 論

化粧品中の防腐剤成分13物質の一斉分析法の検討を行った。移動相条件の検討を行ったところ、酢酸アンモニウム緩衝液とアセトニトリル混液を用いた方法により、各成分が良好に分離した。さらに、従来法と同等の結果が得られながら、有機溶媒の使用量を削減することに成

功した。また、良好な直線性の範囲、検出限界が確認され、添加回収試験の結果、真度、精度ともに良好であった。実製品への適用を行ったところ、従来の移動相条件と比較し、同等の定量値が得られたことから化粧品中の防腐剤13成分のスクリーニング法として有用であると考えられた。

(平成24年8月1日受理)

表4 実製品への適用

試料	成分	定量値(mg/g)	
		本法	従来法
化粧水1	MP	1.73±0.05	1.76±0.01
化粧水2	MP	1.56±0.12	1.48±0.05
	PE	1.53±0.08	1.50±0.02
化粧水3	PE	3.16±0.07	3.11±0.06
	MP	1.01±0.04	1.01±0.02
化粧水4	SA	0.46±0.02	0.53±0.02
化粧水5	MP	1.05±0.05	1.12±0.03
	PP	0.93±0.03	0.97±0.03
化粧水6	PE	3.03±0.05	3.03±0.05
	MP	1.34±0.04	1.36±0.02
シャンプー1	BA	1.73±0.04	1.70±0.01
シャンプー2	BA	2.56±0.04	2.54±0.03
	MP	2.06±0.05	2.06±0.02
	PP	1.05±0.04	0.98±0.02
シャンプー3	BA	0.39±0.01	0.40±0.01

平均±標準偏差(n=5)

文献

- 1) 厚生省：化粧品基準，平成12年9月29日，告示第331号（2000）
- 2) 森謙一郎，中村義昭，大貫奈穂美，寺島潔，宮本道子，荻野周三ほか：化粧品中防腐剤の検査結果（平成16-18年度）と検査法の改良，東京都健康安全研究センター研究年報，**58**，103-106（2007）
- 3) 3.2化粧品試験法，衛生試験法・注解2010，日本薬学会編，pp.674-676，金原出版，東京（2010）
- 4) 沢辺善之，川口正美：HPLCを用いた化粧品中の防腐剤の定量法，大阪府立公衆衛生研究所報，**47**，33-36（2009）
- 5) 土井佳代：化粧品中のフェノキシエタノールの高速液体クロマトグラフィーによる分析，神奈川県衛生研究所研究報告，**32**，85-87（2002）
- 6) 五十嵐良明，宮澤法政，島村公雄，佐藤信夫，吉沢賢一，林正人ほか：高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤クロルフェネシンの定量，国立医薬品食品衛生研究所報告，**127**，50-53（2009）
- 7) 3.2化粧品試験法，衛生試験法・注解2010，日本薬学会編，pp.673，金原出版，東京（2010）
- 8) Mikami,E., Goto,T., Ohno,T., Matsumoto,H. and Nishida, M.:Simultaneous analysis of dehydroacetic acid, benzoic acid, sorbic acid and salicylic acid in cosmetic products by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography,J.Pharm. Biomed. Anal., **28**, 261-267（2002）