

## 短報

# フェニルカラムを用いた 液体クロマトグラフィーによる 化粧品中の防腐剤の一斉分析法の検討

羽田千香子, 甲斐茂美, 熊坂謙一, 宮澤眞紀

## Simultaneous analysis of preservatives in cosmetics by HPLC using Phenyl Column

Chikako HADA, Shigemi KAI, 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、ほとんどの製品に防腐剤が配合されている。その配合制限については、化粧品基準別表第3に詳細が記載されており、製造にあたり遵守する基準となっている<sup>1)</sup>。

過去に著者らは、化粧品基準に記載されている防腐剤のうち東京都の報告<sup>2)</sup>から汎用性がある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)) について、ODSカラムを用いたHPLC法による一斉分析法を報告した<sup>3)</sup>。しかしながら、このうち、IBPとBPについては、分離度が1.3と完全分離である1.5に満たない状況であった。成分の同定のためには、分離度の改善が必要であると考えられる。そこで新たな一斉分析法の開発のため、機器条件等の検討を行ったところ、分離度が改善し有用な結果を得たので報告する。

### 方法

#### 1. 試薬

防腐剤の標準品として、PE, MP, EP, BP, SA, BA, DA, IM及びSOは和光純薬工業(株)(現:富士フィルム和光純薬(株))製の和光特級を用いた。IP(純度

98%), IBP(純度98%)は富士フィルム和光純薬(株)より購入した。CPはAlfa Aesar製(純度99%), PPは東京化成工業製(等級:GR)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富士フィルム和光純薬(株)製のHPLC用を用い、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、HPLCシステムとして、島津製作所製Nexera-i LC-2040シリーズを用いた。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YMC-Triart Phenyl(粒径1.9  $\mu$ m, 2.0 mm  $\phi$   $\times$  75 mm,ワイエムシー製)、Inertsil Ph-3(粒径3  $\mu$ m, 3.0 mm  $\phi$   $\times$  150 mm,ジーエルサイエンス製)及びAcquity UPLC BEH Phenyl(粒径1.7  $\mu$ m, 2.1 mm  $\phi$   $\times$  100 mm,ウォーターズ製)を用い、カラム温度は45  $^{\circ}$ C、移動相はA液(10 mmol/l酢酸緩衝液)とB液(5 mmol/l 酢酸含有メタノール/アセトニトリル(1:1))を用いたグラジエント送液とした。10 mmol/l酢酸緩衝液は、酢酸ナトリウム三水和物0.68gに酢酸287  $\mu$ lを添加し、水を加えて1lとして調製した。送液条件は、流量0.5 ml/minにてA液/B液混合比率95:5を初期条件として1分間保持した後、24分間で混合比率60:40まで直線的に変化させた。注入量は1  $\mu$ lとした。メンブランフィルターはメルクミリポア製マイレクスLG(孔径0.20  $\mu$ m, 直径13 mm)を用いた。

#### 3. 標準溶液調製

各標準品約50 mgを精密に量り、メタノールを用いて溶解し、各々5 mg/mlの標準原液とした。さらに直線性範囲の確認用として、各原液につきメタノールを用いて混合、希釈し、2.5, 5, 10, 50, 75, 125及び250  $\mu$ 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  $\mu$ g/mlの混合標準溶液を調製した。

#### 4. 直線性

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、成分濃度とピーク面積値との回帰直線の相関係数から直線性の範囲を評価した。

#### 5. 試料溶液調製

試料約0.4 gを精密に量り、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、メタノールを加えて正確に20 mlとした後、遠心分離し上澄液を得た。

この液をメンブラン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、クリーム及びシャンプーを用い、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 mg/g, 2.5 mg/g, 5 mg/gになるよう添加し、繰り返し回数は6回とした。

## 7. 実製品への適用

BA, PE, MP, PP, 及びBPを含む化粧水、クリーム及びシャンプーについて、5. 試料溶液調製と同様に調製し、上記の分析条件にて含有成分を定量した。併せて既報<sup>3)</sup>を用いて分析し、定量値及び標準偏差を比較した。

## 結果及び考察

### 1. 分離度の改善に向けた検討

IBPとBPの分離度を改善するためには、ピーク形状を維持したまま十分なピーク保持時間の差を確保するか、理論段数の向上を目指す対応が考えられる。ところが、IBPとBPは構造異性体であるため、一斉分析におけるグラジエント送液では、その送液条件を変更するのみではピークの保持時間の差異を確保することは非常に困難であった。そのため、理論段数を向上させる条件について検討することとした。すなわち、充填剤の粒子径の小さい(2 $\mu$ m以下)カラムを選択することとし、そのために必要な高圧仕様のHPLC条件を検討した。また、カラムの充填剤については、フェニル基等の $\pi$ 電子を有する構造異性体の分離に向くとされているフェニルカラムの適用について検討することとした。既報<sup>3)</sup>及び青山らの報告<sup>4)</sup>ではODSカラムを用いていることから、フェニルカラムの使用は異なるメカニズムを用いる点でも有用であると考えられた。同じフェニルカラムでも製造メーカー

ごとにエンドキャップの有無、炭素含有率、比表面積、スパーサーが異なることから、スパーサーの種類や炭素含有率の観点で異なる3種のカラムを検討することとした。13成分全てのピーク間の分離度1.5以上となるクロマトグラムを得たことから、最終的に化学修飾基にフェニルブチル基を有するYMC-Triart Phenylを選定した。

移動相については、水系溶液としては酸性度を、有機溶媒についてはアセトニトリル、メタノールを検討することとした。水系溶液としては、0.1%りん酸、0.1%酢酸、pH4.7の酢酸緩衝液及びpH6.9のりん酸緩衝液等を用いた。有機溶媒の選定にあたっては、フェニルカラムの $\pi$ - $\pi$ 電子相互作用に基づく選択性を利用する点ではメタノールの方が有利と考えられる<sup>5)</sup>が、機器の耐圧性能を考慮し、システム圧を抑える目的からアセトニトリルとの混液とした。カラム温度は、圧力上昇を抑制するため、既報より5 $^{\circ}$ C高い45 $^{\circ}$ Cとした。更に、高速化のため、できる限り流量を上げることとし、0.5 ml/minとした。

最終的に移動相として10 mmol/l酢酸緩衝液、5 mmol/l酢酸含有アセトニトリルとメタノール(1:1)を用いたグラジエント送液の条件により、全ての成分で分離度1.9以上を達成した。クロマトグラムを図1に示す。また、流量を上げることとカラム長の短いカラムを用いることで高速分析が可能となり、1回あたりの分析時間が48分から32分へ16分短縮した。

溶出順については、既報と比較してDAとPE、IBP及びBPとIMの間で変化が生じた。本法と既報では移動相の組成は類似していることから、主にカラム充填剤の修飾基の変更が分離挙動に影響した可能性が考えられた。すなわち、充填剤の修飾基を疎水性相互作用の違いによる分離挙動を示すODS基から、疎水性相互作用に加えて $\pi$ - $\pi$ 電子相互作用を併せ持つフェニルブチル基に変えたことで、対象成分とカラム充填剤の修飾基の相互作用に変化が生じたと考えられる。本法により、IBPとBPの分離度が改善しただけではなく、既報の代替法あるいは

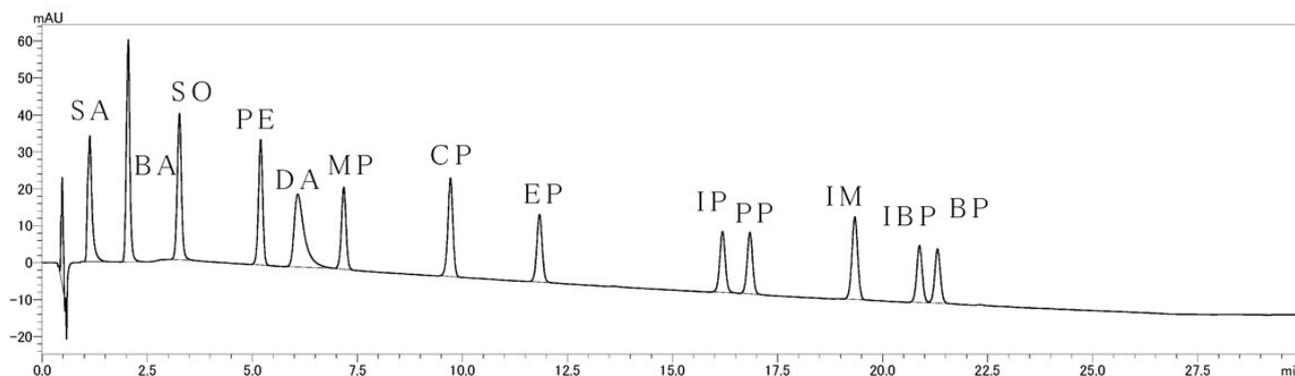


図1 防腐剤13成分のクロマトグラム

既報との併用により、検出成分の確認手段として有用であると考えられる。

2. 直線性範囲及び検出限界

混合標準溶液を用いて分析を行ったところ、直線性範囲、回帰式及び相関係数は表1のとおりであった。各成分とも相関係数0.999以上であり、良好な直線性を確認できた。また、検出限界はPDAスペクトルが確認できる濃度とし、概ね1 μg/mL程度であった。

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
	μg/ml		
SA	2.5~250	y = 5028x - 30.88	0.9998
BA	2.5~125	y = 6768x - 1731	0.9998
SO	2.5~125	y = 5471x - 290.7	0.9998
DA	5~125	y = 6864x - 11884	0.9998
MP	5~250	y = 2743x + 3341	0.9999
PE	2.5~125	y = 4608x - 679.6	0.9998
CP	2.5~125	y = 4470x - 1098	0.9998
EP	5~125	y = 3175x - 1067	0.9998
IP	5~125	y = 2910x - 2433.5	0.9998
PP	5~125	y = 2927x - 1390	0.9998
IM	2.5~125	y = 4358x - 893.1	0.9998
IBP	5~125	y = 2693x - 1247	0.9998
BP	5~125	y = 2731x - 1661	0.9998

3. 真度及び精度

添加回収の回収率をそれぞれ表2に示す。クリームで回収率の低下とバラツキが見られたが、これは脂溶性の高い成分を含むことからメタノールを加えてもサンプルが完全には溶解せず、試料溶液調製の際に若干の偏りが発生したためと思われるが、全体としては概ね100%近い回収率であり、良好な結果を得た。

4. 試料への適用

化粧水、クリーム及びシャンプー各2製品を対象に分析を実施した。定量値を表3に、各製品のクロマトグラムを図2に示す。試料(B)で保持時間約21分に検出波長262 nmでグリチルリチン酸のピークを認めたが、対象成分のピークとの重なりはなく、本分析条件において防腐剤13成分のピークに対する他の配合成分の影響は見られなかった。また検出された成分は製品の表示成分と一致しており、既報と同等の定量値が得られた。

結論

化粧品中の防腐剤成分13成分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、酢酸緩衝液とメタノール及びアセトニトリル混液を用いたグラジエント送液により、IBPとBPの分離度1.9を達成した。また、直線性、定量限界、添加回収試験の結果も良好であった。また、実製品への適用を行い既報と同等の定量値を示すことから、既報の代替法として使用できる他、既報で検出されたピークの再確認法として検査結果の信頼性向上に資すると考えられる。

文献

- 1) 化粧品基準，厚生省告示第331号，平成12年9月29日
- 2) 森謙一郎，中村義昭，大貫菜穂美，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) 羽田千香子，熊坂謙一，宮澤真紀：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

表2 防腐剤成分の添加回収試験

成分	化粧水			クリーム			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	0.5 mg/g	2.5 mg/g	5 mg/g
SA	101.5±1.3	99.0±1.3	99.3±0.6	89.2±4.1	94.6±1.9	93.9±0.8	96.3±1.5	97.3±3.9	100.6±2.3
BA	100.1±1.0	100.7±1.0	100.5±0.5	101.6±5.5	96.5±1.8	94.2±0.7	93.5±1.1	95.1±3.7	97.9±2.2
SO	99.6±1.2	100.5±1.1	100.2±0.5	99.6±4.4	95.4±2.0	93.9±0.5	95.8±1.7	95.7±3.6	97.9±2.1
PE	100.7±1.0	101±0.9	100.6±0.6	98.8±5.4	95.3±1.9	93.9±0.6	96.4±1.5	96.1±3.6	98.7±2.1
DA	101.6±1.1	100.6±0.9	100.3±0.5	101.4±7.3	96.9±2.0	95.5±0.6	98.8±1.4	92.1±3.6	95.1±2.0
MP	99.6±1.2	100.3±1.0	99.7±0.6	90.6±4.7	94.2±2.0	93.1±0.8	93.5±1.1	96.3±3.9	99.3±2.2
CP	99.6±0.9	100.1±0.9	100.0±0.7	90.6±4.1	93.9±2.0	92.9±0.9	95.8±1.7	96.2±4.0	99.4±2.3
EP	99.6±1.2	100.2±1.0	99.8±0.7	88.1±4.3	93.5±2.0	93.0±0.8	96.4±1.5	95.7±3.7	99.0±2.3
IP	99.7±0.9	100.1±0.9	99.8±0.6	83.1±3.7	93.3±3.2	92.9±0.7	89.3±1.5	94.5±3.9	98.4±2.2
PP	98.9±0.7	100.0±0.9	99.7±0.6	89.8±4.1	93.6±1.9	92.7±0.8	91.6±1.6	94.9±3.9	98.1±2.2
IM	99.0±0.8	98.4±0.9	98.3±0.6	87.7±4.4	91.5±1.8	91.5±0.7	94.2±1.4	95.5±3.8	98.6±2.3
IBP	101.7±0.8	100.2±0.9	99.8±0.6	96.1±4.8	94.0±1.9	93.3±0.8	96.6±1.5	96.3±3.9	99.2±2.2
BP	102.1±1.2	100.2±1.0	99.5±0.7	91.7±3.8	92.7±1.9	92.6±0.7	95.9±1.2	96.2±4.0	99.1±2.2

平均 (%) ±標準偏差, n=6

表3 実製品の定量値 (mg/g)

試料	成分	定量値(mg/g)	
		本法	既報
化粧品1	PE	1.98±0.01	1.89±0.00
	MP	0.98±0.01	0.97±0.00
化粧品2	PE	2.82±0.03	2.78±0.00
	MP	1.46±0.01	1.56±0.01
クリーム1	PE	5.25±0.03	5.10±0.00
	MP	1.78±0.02	1.82±0.00
	PP	0.59±0.01	0.61±0.00
クリーム2	PE	1.93±0.02	2.04±0.00
	MP	1.78±0.02	1.82±0.00
	BP	0.27±0.00	0.29±0.00
シャンプー1	BA	2.47±0.01	2.48±0.00
	PE	2.87±0.03	3.00±0.00
シャンプー2	BA	4.83±0.09	4.87±0.02
	PE	5.66±0.09	6.00±0.00

平均±標準偏差, n=3

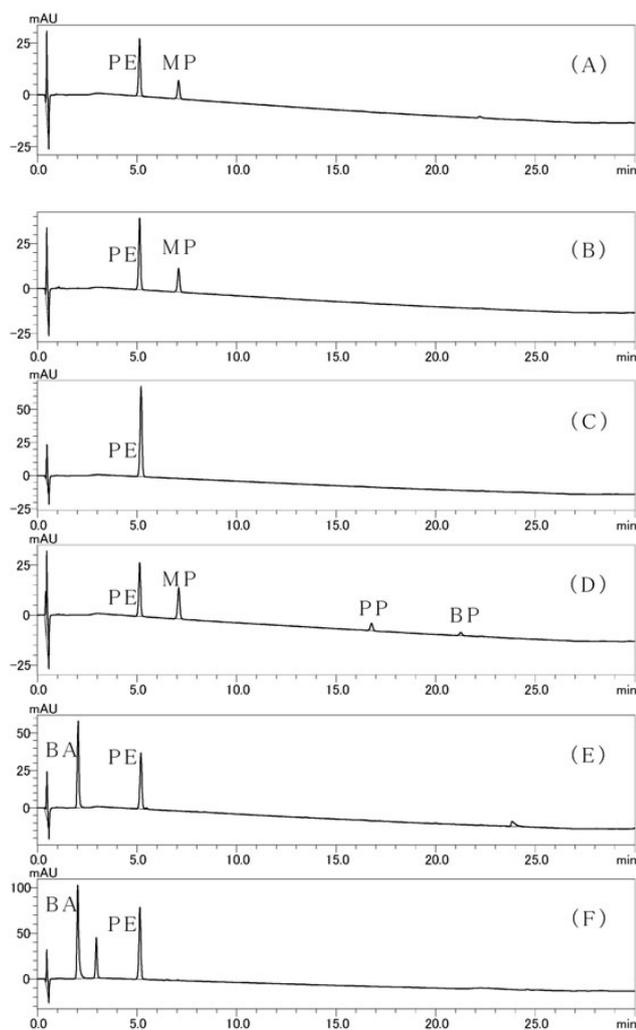


図2 実サンプルのクロマトグラム

(A) 化粧品1 (B) 化粧品2 (C) クリーム1  
(D) クリーム2 (E) シャンプー1 (F) シャンプー2

化粧品に配合される防腐剤の一斉分析法の検討, 神奈川県衛生研究所研究年報, **42**,27-31(2012)

- 4) A.Aoyama, T.Doi,T.Tagami and K.Kajimura : Simultaneous Determination of 11 Preservatives in Cosmetics by High-Performance Liquid Chromatography , Journal of Chromatographic Science , **52**,1010-1015 (2014)
- 5) M.Yang,S.Fazio,D.Munch and P.Drumm:Impact of methanol and acetonitrile on separations based on  $\pi$ - $\pi$  interactions with a reversed-phase phenyl column,Journal of Chromatography A, **1097**,124-129(2005)