神奈川県衛生研究所研究報告　No. 52 (2022)
Bull. Kanagawa Ins. of P.H.

短報

化粧品中のユビデカレノンの分析法の検討

羽田千香子，甲斐茂美

Analytical method of Ubidecarenone in cosmetics

Chikako HADA，Shigemi KAI

緒言

ユビデカレノン（CoQ10）はユビキノン－10又はコエンザイムQ10とも言われ，動植物の体内で生合成される成分であり，ミトコンドリアに最も多く存在し電子伝達系における補酵素としてエネルギー産生に関与することが知られている[1,2]．また，医薬品では「基礎治療施行中の軽度及び中等度のうっ血性心不全症状」の効能効果[3]で承認され，医薬部外品，化粧品では保湿効果等，健康食品では疲労感軽減等を謳った製品として幅広く利用されている．化粧品への配合については，医薬品成分に該当していることから化粧品基準[4]により禁止されていたが，平成16年10月１日付け化粧品基準の一部改正により配合できる成分の範囲が拡大され，「粘膜に使用されることがない化粧品」については，化粧品100 g中の最大配合量として0.03 gまで配合できることとなった[5]．

ユビデカレノンの分析法としては，日本薬局方各条ユビデカレノン定量法[6]（以下，日局とする）のほか，HPLC-ECD法[7]，HPLC-UV法[8]等が報告されている．しかし，これらは移動相に用いる有機溶媒を100%近い割合で使用しているため，多種多様な成分を有する化粧品においては，極性成分のいずれかがカラムに残ってしまい分析に支障をきたす恐れがある．そこで，化粧品中の極性成分による妨害を除去することを目的とし，カラム，移動相，抽出法の検討を行った．

方法

１．試薬

標準品として，富士フイルム和光純薬株式会社のユビキノン－10（和光特級，規格含量98.0%以上）を用いた．アセトニトリル，メタノールはHPLC用を，エタノールはエタノール（99.5），JIS特級を用いた．

２．試料

ユビデカレノンの使用頻度が多いことから乳液及びクリームを，また「粘膜に使用されることがある化粧品」に該当することからユビデカレノンは配合禁止である口腔洗浄液及び口紅[9]を対象とした．

３．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，検出波長は275 nm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 μm，直径13 mm）を用いた．

４．HPLC分析条件

分析カラムはKinetex 2.6 μm Biphenyl 100Å（2.6 μm，3.0 mmφ×150 mm，phenomenex社製）を用い，カラム温度は40℃，移動相は水とアセトニトリルを用いたグラジエント送液とした．流量は0.5 ml/minで水/アセトニトリル混合比率50：50を初期条件として３分間でアセトニトリル100%まで直線的に変化させた後，10分間保持する条件とした．注入量は2 μlとした．

５．標準溶液調製

標準品約15 mgを精密に量り，エタノールを用いて溶解し，150 μg/mlの標準原液とした．標準原液を段階的に希釈し，3.75，7.5，15，30，60，120及び150 μg/mlの標準溶液を調製した．

６．試料溶液調製

試料約1 gを精密に量り，エタノールを3 ml加え，10分間超音波処理したのち，遠心分離(2800 rpm，5min)し上澄液を採取した．残渣について，エタノールを3 ml加え10分間超音波処理したのち，同様に遠心分離し，上澄液を先の上澄液と合わせた．本操作を２回行った後，エタノールを用いて10 mlに定容して転倒混和した後，メンブランフィルターでろ過し試料溶液とした．

７．添加回収試験

ユビデカレノンが不含であることをあらかじめ確認した乳液，クリーム，口腔洗浄液及び口紅を用い，標準原液を添加し，その回収率を求めた．添加量は化粧品中の配合量として0.03 g/100 gになるよう添加し，繰り返し回数は６回とした．

８．市販化粧品への適用

ユビデカレノンの表示のある乳液１製品及びクリーム２製品について，上記の条件を用いて定量した．

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

結果及び考察

1．HPLC条件の検討

HPLC条件は日局[6]を参考にした．ただし，化粧品におけるユビデカレノンの配合量は医薬品原料に比べて極少量のため，低濃度での分析及び化粧品に含有される多種多様な成分との分離も考慮する必要がある．また，分析対象の化粧品がユビデカレノンより極性が大きく異なる成分を含む場合，対象成分の分析に焦点を当てたアイソクラティックモードではそれらがカラムに残ってしまい分析に支障をきたす恐れがある．これらのことから，感度や理論段数の向上に考慮しつつ，水の割合をできるだけ高い状態とする有機溶媒とのグラジエント条件を検討することとした．

移動相に用いる有機溶媒の選定のため，ユビデカレノン標準品の30 μg/mlアセトニトリル溶液5 μlについて，移動相としてメタノール，エタノール及びアセトニトリル各100%として，流量を1.6 ml/min（日局[6]の移動相条件メタノール/エタノール（13:7）で約10分に当該ピークが検出される流量），ODSカラムであるUnison US-C18（5μm， 4.6 mmφ×150 mm，インタクト製）を用いて測定したところ，メタノールでは約30分，エタノールでは約２分にピークを検出したが，アセトニトリルでは30分以内にピークは検出されなかった．水とメタノール，水とアセトニトリルのグラジエント法とした場合保持時間はさらに遅くなり，また，水とエタノールのグラジエント法ではカラム圧が耐圧上限近くまで上昇したことから，カラムの修飾基を変更することとした．

カラム修飾基の選定にあたり，目的成分はイソブレン基を多く有しπ電子を多く含むことから，フェニルカラムであるInertsil Ph-3（3 μm，3.0 mmφ×150 mm，ジーエルサイエンス製），ビフェニルカラムであるKinetex 2.6 μm Biphenyl 100Åを用いることとした．２本のカラム各々について移動相としてメタノール，エタノール及びアセトニトリル各100%を用いて流速0.4 ml/minで分析したところ，ビフェニルカラムで移動相にメタノールを用いた場合では約13分にピークを検出したが，それ以外の条件では各カラムとも５分以内に検出した．いずれの有機溶媒でも適切な保持時間で検出したことからカラム圧をなるべく低くするためアセトニトリルを選択し，水，アセトニトリルを用いたグラジエント条件を検討した．流量は0.5 ml/min，注入量2 μl，ビフェニルカラムを用い，アセトニトリルの割合を初期条件50%から３分間で100%まで上げる条件で目的成分のピーク形状及び感度が良好であった（図１）．

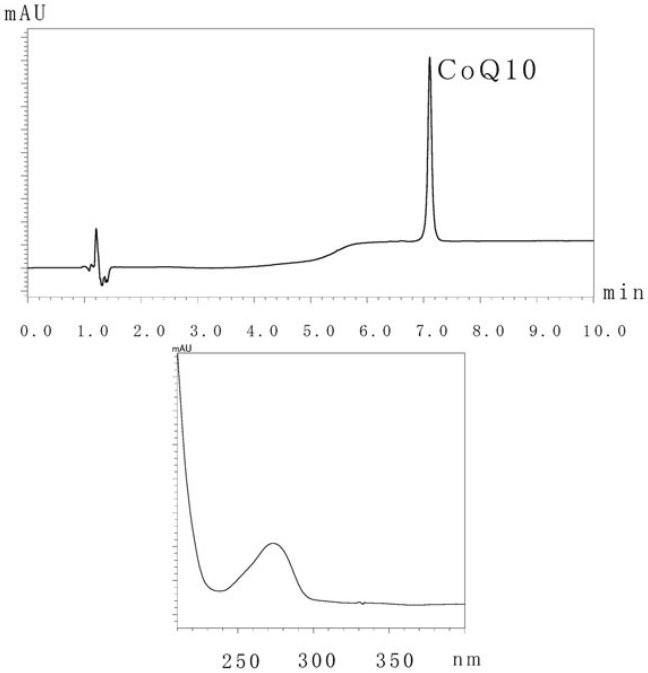

図１ ユビデカレノン標準溶液のクロマトグラム（上）及びPDAスペクトル（下）

2．直線性及び検出限界

標準溶液について各濃度を３回繰り返し注入し，ユビデカレノンの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確認した．その結果，標準溶液濃度3.75～150 μg/mlの範囲で相関係数は0.999以上となり，良好な直線性が得られた．また，検出限界はPDAスペクトルが確認できる濃度とし，2 μg/mlであった．

3．抽出方法の検討

試料1 gを10 mlメスフラスコに採取したのち，移動相に合わせて抽出溶媒はアセトニトリルを加えた．超音波処理後定容し，フィルターろ過して試料溶液とした．方法４．を用いて分析したところ，全体的に回収率が著しく低かった（10%～60%）．これは，化粧品に配合される脂溶性成分とユビデカレノンの親和性が高く，アセトニトリルへの移行が十分ではなかったためと思われた．そこでユビデカレノンの溶解性がアセトニトリルより高いエタノールを抽出溶媒に用いるほか，抽出方法と回数を変更して行うことを検討した．試料1 gを50 ml遠沈管に採取したのち，エタノールを加えて超音波処理して分散させた後，遠心分離して上澄液を10 mlメスフラスコにとり，残渣についてエタノールを加える操作から１回または２回同様に行った後10 mlに定容し，フィルターろ過した液を試料溶液とした．前の方法と回収率を比較したところ口紅のみ２回抽出で不十分であったが，３回抽出することで良好な回収率を得ることができた．このことから全ての試料で３回抽出を行うこととした．

４．ユビデカレノンと化粧品成分との分離

ブランク試料を本法に従って分析したところ，ユビデカレノンの保持時間にピークが検出されないことを確認した（図２，a-1，b-1，c-1，d-1）．各試料にユビデカレノン0.03 g/100 gを添加し，同様に分析したところ，いずれの試料においてもユビデカレノンのピークが化粧品由来成分と良好に分離されること（図２，a-2，b-2，c-2，d-2），連続分析でも妨害成分が検出されなかったことから，本条件を採用することにした．

５．添加回収試験

回収率は86.5～97.2%となり口紅でやや低い結果となったが，全体として概ね良好な回収率が得られた（表１）．

表１　ユビデカレノンの添加回収試験

試料	回収率	
	平均(%)±標準偏差	RSD(%)
乳液	94.6±0.3	0.3
クリーム	97.2±0.7	0.7
口腔洗浄液	96.3±0.5	0.5
口紅	86.5±2.0	2.3

n=6

６．市販化粧品への適用

市販されている乳液１製品及びクリーム２製品を対象に分析を実施した．定量値を表２に，乳液及びクリーム１のクロマトグラムを図３に示した．クリーム２で定量値にバラツキが見られた．なお，いずれの試料も化粧品基準を満たしていた．

表２　市販化粧品の定量値

試料	定量値(mg/100 g)
乳液	9.53±0.18
クリーム1	9.37±0.44
クリーム2	14.41±1.38

平均±標準偏差，n=3

結論

化粧品中のユビデカレノンの分析法について抽出方法及びHPLC条件の検討を行ったところ，抽出溶媒にエタノールを用い，カラムはビフェニルカラム，水とアセトニトリルによるグラジエント送液によりユビデカレノンと化粧品成分を分離することができ，良好なピークを得た．また，直線性，検出限界を確認し，添加回収試験の結果も概ね良好であった．さらに，市販化粧品への適用を行い定量値を確認したところ，いずれの試料も化粧品基準を満たしており，本分析法適用の可能性を確認できた．今後は口紅における回収率の改善や化粧品の種類や製品数を増やす等，更なる検討に努めていきたい．

参考文献

１）第十八改正日本薬局方解説書－条文・注・解説－，C-5903-5904，廣川書店，東京（2021）

２）内閣府，第29回新開発食品専門調査会資料５，平成17年11月７日

３）医薬品インタビューフォーム，代謝性強心剤イノキノン，2021年11月改訂（改訂第11版）

４）化粧品基準，厚生省告示第331号，平成12年９月29日

５）化粧品基準の一部を改正する件について，厚生労働省告示第370号，平成16年10月１日

６）第十八改正日本薬局方，厚生労働省告示第220号，令和３年６月７日，1749-1750

７）A.Hirayama, H.Kubo, M.Mita, O.Shirota and Y. Yamamoto: High-Sensitivity Simultaneous Analysis of Ubiquinol-10 and Ubiquinone-10 in Human Plasma, Journal of Chromatographic Science, **46**, 717-712 (2008)

８）服部暁史，青木由典，阿部皓一，芦澤一英，岡本正志，塚本靖和: 栄養ドリンク中の酸化型および還元型コエンザイムQ10の定量と保存中のコエンザイムQ10の温度安定性，ビタミン，**90**，334-340 (2016)

９）化粧品の全成分表示の表示方法等について，医薬審発第163号，医薬監麻発第220号，平成13年３月６日

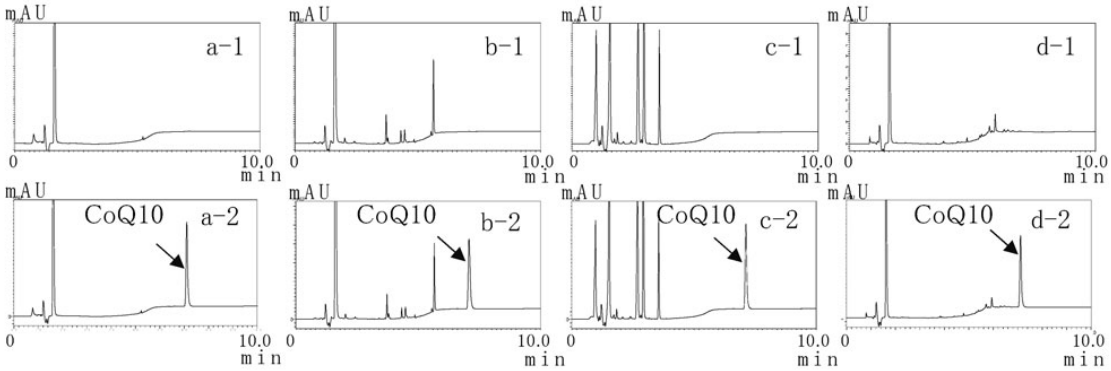

図 2　ユビデカレノン未添加及び添加時の化粧品のクロマトグラム
a： 乳液, b： クリーム, c： 口腔洗浄液, d： 口紅
1： ユビデカレノン未添加（ブランク試料），2： ユビデカレノン0.03 g/100 g添加

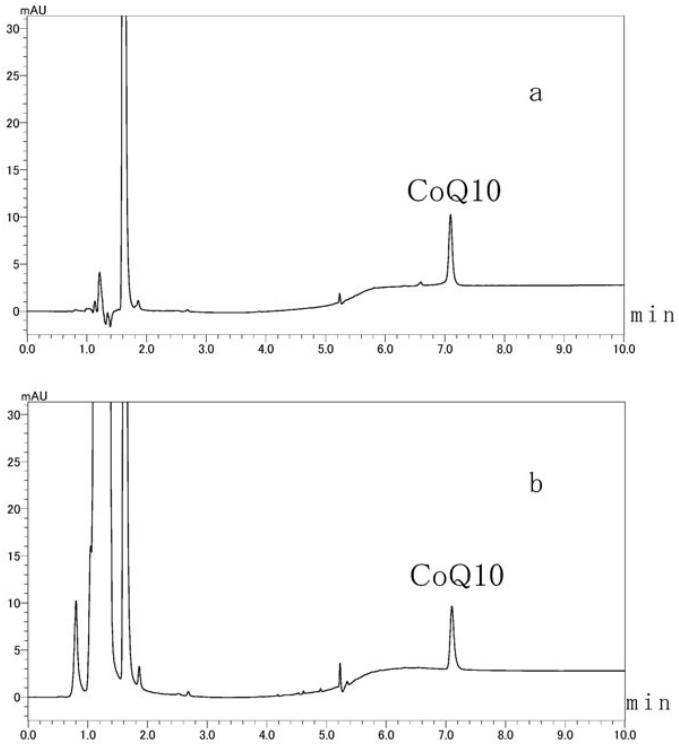

図 3　市販化粧品のクロマトグラム
a： 乳液　b： クリーム１