

HPLC を用いた化粧品中の防腐剤の定量法

沢辺 善之* 川口 正美*

HPLC を用いた化粧品中の防腐剤の一斉分析法を検討した。従来の ODS 系カラムを用いる分析法に比べて、Discovery RP Amide C16 カラムを用いることで、薄めたリン酸とアセトニトリルの混液という調製の簡単な移動相で一斉分析が可能となった。この方法の分析法バリデーションでは、真度、精度、直線性、特異性及び定量限界濃度のいずれも満足できる結果であった。また、市販化粧品に含まれる防腐剤の含有量を従来法と比較したところ、同等の定量値を示し、有用な分析法であることを確認した。

キーワード : 防腐剤、高速液体クロマトグラフィー、化粧品

key words : antiseptics, HPLC, cosmetics

大阪府では薬事法に基づく収去試験の一環として、化粧品に含まれる配合制限成分¹⁾の分析を行っている。主な分析対象物は防腐剤であり、その含有量が配合制限内であることを確認している。従来、収去品目の成分表示やメーカーの成分表から、測定対象とする防腐剤を絞り、個々に分析法を選定し、その含有量を測定してきた。本報では、主な防腐剤の一斉分析法を検討したので報告する。

実験方法

1. 試薬

フェノキシエタノール、パラベン類 6 種 (メチルパラベン、エチルパラベン、イソプロピルパラベン、プロピルパラベン、イソブチルパラベン、ブチルパラベン)、ソルビン酸、安息香酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸は和光純薬工業株式会社 (大阪) から購入し標準品として用いた。4-ヒドロキシ安息香酸 n-アミルは東京化成工業株式会社 (東京) から購入し内標準物質として用いた。その他の試薬は特級品を用いた。

* 大阪府立公衆衛生研究所 衛生化学部 薬事指導課
Determination of Antiseptics in Cosmetics by HPLC
by Yoshiyuki SAWABE and Masami KAWAGUCHI

2. 装置及び測定条件

HPLC 装置は島津 HPLC LC-10 CLASS-VP システムを用いた。

HPLC 測定条件

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器 (測定波長
フェノキシエタノール : 220 nm、パラベン類 : 254 nm、ソルビン酸 : 260 nm、安息香酸 : 230 nm、デヒドロ酢酸 : 310 nm、サリチル酸 : 205 nm、内標準物質 : 254 nm)

カラム : Discovery RP Amide C16, 25 cm × 4.6 mm,
5 μm (SUPELCO)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : 薄めたリン酸 (1→1000) / アセトニトリル
混液 (55 : 45)

流量 : 1 mL / min

3. 試料溶液の調製

試料約 0.2 g を精密に量り、内標準溶液 2 mL を正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした液を 5 分間激しく振り混ぜた。この液を 0.45 μm のフィルターでろ過した液を試料溶液とした。

内標準溶液は 4-ヒドロキシ安息香酸 n-アミル (IS) 0.1 g をとりメタノールで 100 mL とした。

4. 標準溶液の調製

フェノキシエタノール及びパラベン類は、それぞれ

約 0.1 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。ソルビン酸及びデヒドロ酢酸は、それぞれ約 0.05 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。安息香酸及びサリチル酸は、それぞれ約 0.02 g を精密に量り、メタノールで 100 mL とした。これらの液を標準原液とした。

フェノキシエタノール、安息香酸及びパラベン類のそれぞれの標準原液 2 mL を正確にとり、内標準溶液 2 mL を正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした混液を標準溶液-1 (STD-1) とした。同様に、ソルビン酸、デヒドロ酢酸及びサリチル酸の混液を調製し、標準溶液-2 (STD-2) とした。この 2 種の標準溶液を添加回収実験の対照溶液とした。また、化粧品中の防腐剤の定量用標準溶液とした。

5. 添加回収実験

各防腐剤を化粧品に添加し、その回収率を求め、本法の真度及び精度を検討した。回収率を真度とし、回収率の相対標準偏差 (RSD) を精度とした。

各防腐剤の添加量は、配合制限量の上限とした。

検体とした化粧品は 3 種で、ジェル、乳液及び化粧水である。検体約 0.2 g を精密に量り、防腐剤の標準

原液 2 mL と内標準溶液 2 mL をそれぞれ正確に加え、更にメタノールを加えて 30 mL とした液を 5 分間激しく振り混ぜた。この液を 0.45 μm のフィルターでろ過した液を試料溶液とした。回収率は次式により求めた。

$$\text{回収率 (\%)} = \left(\frac{\text{試料溶液の防腐剤のピーク面積比}}{\text{対照溶液の防腐剤のピーク面積比}} \right) \times 100$$

結果及び考察

1. 分析法バリデーション

1-1 真度 (回収率) と精度 (回収率の RSD)

回収率と RSD を表 1 に示した。回収率は 96.0-104.7 %、RSD は 1 % 以下であり、すべての防腐剤で化粧品の性状に関係なく、良好な真度と精度を確認した。

1-2 直線性と定量限界濃度

標準原液をメタノールで順次希釈した液につき、標準溶液と同様の調製法で標準系列を作成し、直線性を検討した。検討範囲は、各防腐剤の配合上限量の 2 ~ 500 %、検量点数は 18 点とした。表 2 に各防腐剤の回帰式と相関係数 (X 軸: 配合制限量に対する %、Y 軸: ピーク面積比) 及び配合上限量の 2% 濃度における RSD を示した。

表 1 化粧品中の防腐剤の回収率

防腐剤	回収率 RSD (%)					
	検体 1 (ジェル)		検体 2 (乳液)		検体 3 (化粧水)	
①フェノキシエタノール	101.1	0.59	102.3	0.90	100.2	0.49
②ソルビン酸	99.8	0.34	102.8	0.44	99.8	0.06
③安息香酸	96.0	0.66	102.5	0.55	100.2	0.44
④デヒドロ酢酸	100.4	0.53	102.0	0.37	100.1	0.12
⑤メチルパラベン	102.0	0.53	102.3	0.88	100.5	0.66
⑥サリチル酸	101.5	0.66	104.7	0.47	99.3	0.29
⑦エチルパラベン	100.1	0.67	103.9	0.27	100.4	0.75
⑧イソプロピルパラベン	99.6	0.66	103.9	0.54	100.2	0.32
⑨ブチルパラベン	99.8	0.93	103.2	0.23	100.6	0.36
⑩イソブチルパラベン	99.7	0.83	103.0	0.44	100.2	0.72
⑪ブチルパラベン	99.5	0.66	101.8	0.22	100.1	0.42

(n=3)

表 2 防腐剤の直線性

防腐剤	回帰式	相関係数	配合上限量の 2% 濃度での RSD (%)
①フェノキシエタノール	y=0.0055x+0.0097	1.0000	0.56
②ソルビン酸	y=0.0137x+0.0129	1.0000	1.89
③安息香酸	y=0.0023x+0.0015	1.0000	1.01
④デヒドロ酢酸	y=0.0046x+0.0075	1.0000	0.38
⑤メチルパラベン	y=0.0120x+0.0123	1.0000	1.52
⑥サリチル酸	y=0.0049x+0.0343	1.0000	0.65
⑦エチルパラベン	y=0.0112x+0.0121	1.0000	1.49
⑧イソプロピルパラベン	y=0.0108x+0.0076	0.9998	0.09
⑨ブチルパラベン	y=0.0106x+0.0085	1.0000	1.24
⑩イソブチルパラベン	y=0.0110x+0.0067	0.9999	1.03
⑪ブチルパラベン	y=0.0102x+0.0054	0.9988	4.48

すべての防腐剤で回帰式は原点付近を通り、良好な直線性を示し、一点検量線法による定量が可能であった。

定量限界は、当該濃度における RSD が 5 % 以下であり、紫外吸収スペクトルが明確に認められる濃度とした。すべての防腐剤で配合上限量に対して 2 % 濃度が定量限界濃度であった。

1-3 検出波長と特異性

各防腐剤の検出波長は、それぞれの防腐剤の紫外吸収スペクトルの極大吸収波長とした。

標準溶液（配合上限濃度）のクロマトグラムと保持時間を図 1 に示した。

各防腐剤の回収率は 100 % 付近であり、添加試料溶液のクロマトグラムに妨害となるピークを認めなかったため、特異性が高いと判断した。

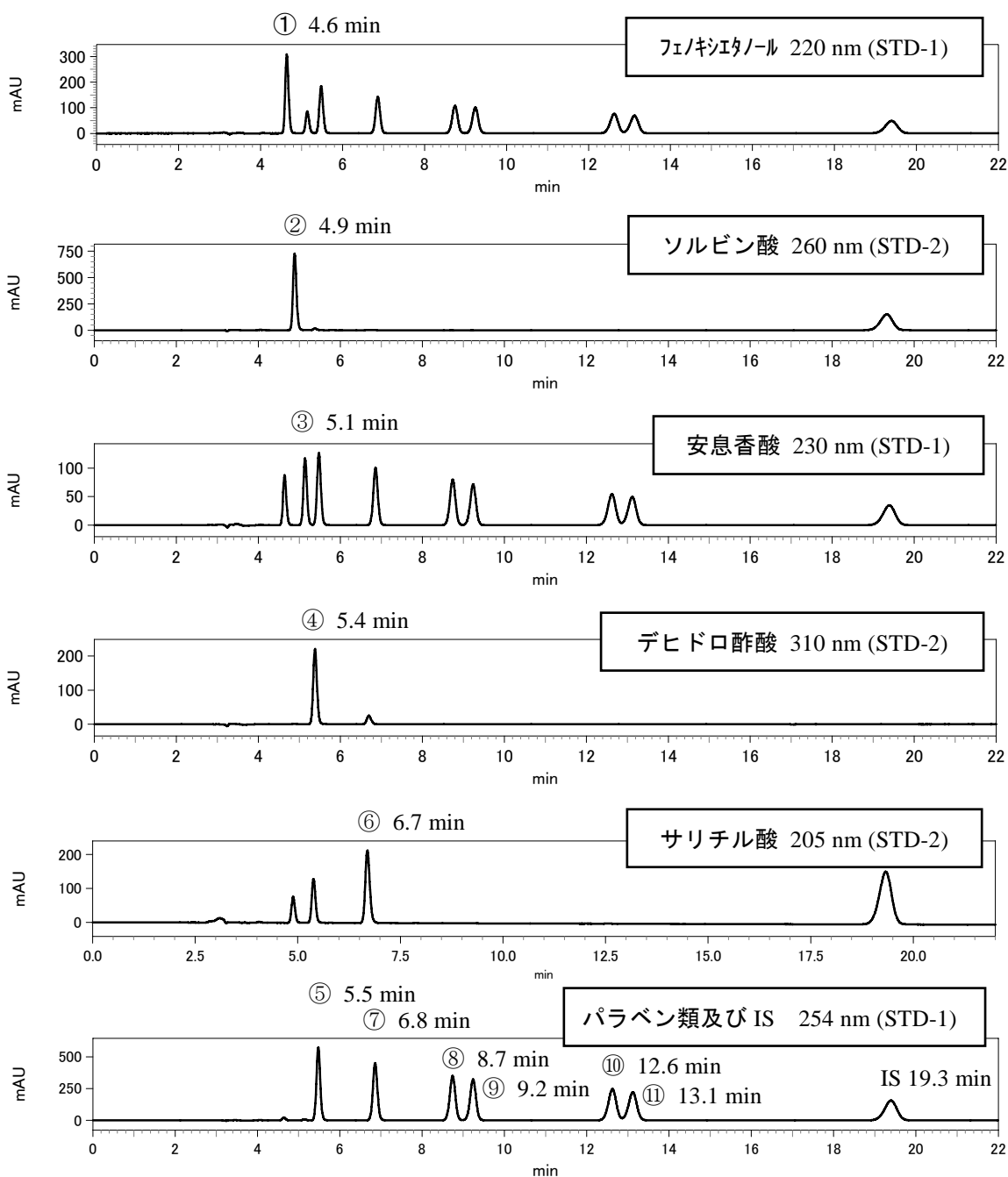


図 1 防腐剤標準溶液のクロマトグラム

2. 化粧品中の防腐剤の定量

本法により化粧品中の防腐剤を定量し、従来法²⁾の定量値と比較することで、本法の信頼性を検証した。

市販化粧品 5 品目を検体とした。配合されていた防腐剤はフェノキシエタノール、メチルパラベン、エチルパラベン及びプロピルパラベンであった。定量値と RSD を表 3 に示した。すべての検体で、従来法とほぼ同じ定量値を示し、バラツキを示す RSD も満足できるものであり、従来法と同等の定量法であることを確認した。

従来法の移動相の調製は、0.05 mol/L リン酸二水素ナトリウムを調製し、メタノール及びアセトニトリルを加え、それに塩化セチルトリメチルアンモニウムを添加し、さらにリン酸で p H5.2 に調整しなければならない。このように調製が煩雑であるだけでなく、イオン対クロマトグラフィーであるためにカラムの平衡化に時間が必要となる。本法では薄めたリン酸とアセトニトリルの混液を移動相とするため、その調製が簡単になり、分析の迅速性も増すものと考えられる。

表 3 本法と従来法による化粧品中の防腐剤の定量値の比較

検体	定量成分	定量値 RSD (%)			
		本法		従来法	
1	フェノキシエタノール	0.31	0.28	0.32	1.48
	メチルパラベン	0.19	0.58	0.19	1.46
	エチルパラベン	0.05	1.25	0.05	1.43
2	フェノキシエタノール	0.32	0.81	0.34	0.92
	メチルパラベン	0.11	0.80	0.11	0.82
	プロピルパラベン	0.11	0.81	0.11	0.82
3	フェノキシエタノール	0.31	0.13	0.31	1.32
	メチルパラベン	0.20	0.06	0.20	1.26
4	フェノキシエタノール	0.52	0.29	0.52	1.76
	メチルパラベン	0.21	0.32	0.21	2.16
5	メチルパラベン	0.03	1.65	0.03	1.74
	エチルパラベン	0.05	0.88	0.05	1.66

(n=3)

まとめ

従来、化粧品の防腐剤の分析には ODS 系のカラムが用いられ、移動相を工夫することにより一斉分析を可能としてきた。³⁾ 今回、Discovery RP Amide C16 カラムを分析に用いた。このカラムは ODS 基の 1 個の炭素がアミド基に変わること、フェノール性水酸基やカルボキシル基と特異的な相互作用を示す。その結果、カウンターイオンを用いることなく、薄めたリン酸とアセトニトリルの混液という調製の簡単な移動相で防腐剤の一斉分析が可能となった。化粧品中の防腐剤の試験において本法は有用であると考えられる。

文献

- 1) 化粧品基準 (平成 12 年厚生省告示第 331 号)
- 2) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解 2005, 668~670, 金原出版, 東京 (2005)
- 3) 森 謙一郎, 中村義昭, 大貫奈穂美, 寺島 潔, 宮本道子, 荻野周三, 斉藤和夫: 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, 第 58 号, 103~106 (2007)