

化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究：エストリオール

徳永裕司[#], 竹内織恵, 内野 正, 安藤正典

Studies for Analyzing the Prohibited Ingredients Such As Estriol in Cosmetics

Hiroshi Tokunaga[#], Oriie Takeuchi, Tadashi Uchino and Masanori Ando

Estriol (EO) is nominated as the prohibited ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method using HPLC for EO was investigated. After placing 1.0 ml of EO solution at 50 µg/ml and 0.5 g of the lotion into a 10-ml volumetric flask, the methanol was added to make until that volume and this solution was used as the testing solution. Milky lotion was proceeded as follows: After placing 1.0 ml of EO solution at 50 µg/ml and 0.5 g of the milky lotion into a 10-ml volumetric flask, the methanol was added to make until that volume. The suspending mixture was moved to a centrifuging tube with a cap. After centrifuging at 3000 rpm for 5 minutes, the supernatant was used as the testing solution. The testing solution of 20 µl was determined by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C₁₈ column, 4.6 x 250 mm), the mixture of water and acetonitrile (31:9) and the detection wavelength of 285 nm. The working curve from 1.0 to 6.0 µg/ml showed a linear line between the concentrations of EO and the peak area. There was no interference of peak of EO from the lotion and milky lotion.

Key Words: estriol, estrogens, Japanese Pharmaceutical Affairs Act, cosmetics

1. 緒言

平成13年4月1日より,化粧品の承認・許可に当たったの規制緩和が行われ,化粧品に使用される成分のポジティブリスト,ネガティブリストの採用および製品に用いられた全成分の表示が義務付けられた.化粧品基準第4条の別表2¹⁾には,化粧品に使用することが制限されている卵胞ホルモン作用を持つ成分,エストラジオール,エストロン又はエチニルエストラジオールが頭部,粘膜部又は口腔内に使用される化粧品の場合,それらの合計量として20000国際単位までの使用が認められている.しかし,卵胞ホルモン作用を持つエストリオール(EO)は医薬品としてのみ使用が認められており,化粧品基準¹⁾により,化粧品への使用が禁止されている.EOは1mgの錠剤あるいは10mgの注射液として,更年期障害,膣炎,老人性骨粗しょう症の治療薬として用いられている.

EOの分析法としては,環境水中の環境ホルモンの固相抽出法および蛍光検出器を用いた液体クロマトグラフ法²⁾,紫外部および電気検出器を用いたEOおよびestriol 3-sulfateのcolumn-switching セミマイクロ液体クロマトグラフ法³⁾,医療用シリコンゴムの皮下埋め込み用具に封入された卵胞ホルモンの体内への透過量の液体クロマトグラフ法⁴⁾など

が報告されている.

今回,著者らは,化粧品に使用することが禁止されている成分,EOの分析法としてCAPCELL PAK C₁₈カラムを用いた液体クロマトグラフ法を検討し,市販化粧水および乳液中のEOの測定に応用したので報告する.

2. 実験

2.1 装置

液体クロマトグラフ(HPLC)装置は,島津製LC-10A型ポンプ,島津製CTO-10A型カラムオープン,島津製SPD-6AV型紫外可視検出器,島津製L-10A型オートサンプラーおよび島津製C-R6A型クロマトパックを連結して用いた.EOの吸収スペクトルの測定には,島津製UV-260型紫外可視分光光度計を用いた.

2.2 試薬および試液

EOおよびメチルパラベン(MP)は和光純薬製のものを用いた.その他の試薬は試薬特級品を用いた.液体クロマトグラフ用カラムは資生堂製のCAPCELL PAK C₁₈(粒径5µm,内径4.6mm,長さ25cm)を購入した.化粧品は市販の化粧水2種類および乳液2種類を用いた.

EO原液:EO約25mgを精密に量り,メタノールを加えて正確に100mLとする.(0.25mg/mL)

EO溶液:EO原液の10mLを正確に量り,50mLのメスフラスコに入れる.メタノールにて50mLとする.(50µg/mL)

[#] To whom correspondence should be addressed: Hiroshi Tokunaga; 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo, 158-8501 Japan; Tel. 03-3700-1141; Fax; 03-3700-9291; E-mail:tokunaga@nihs.go.jp

MP原液：MP約25 mgを精密に量り，メタノールを加えて正確に100 mLとする。(0.25 mg/mL)

MP溶液：MP原液の一定量を正確に量り，メタノールで希釈し，1 mL当たりMP10 μ gを含む溶液を調製する。

2.3 定量法

化粧水の場合：化粧水約0.5 gを精密に量り，10 mLのメスフラスコに入れ，EO溶液1.0 mLを加え，メタノールにて10 mLとし，試料溶液とした。別に，EO約0.025 gを精密に量り，メタノールを加えて溶かし，正確に100 mLとした。この液5 mLを正確に量り，メタノールにて正確に50 mLとした。この液10 mLを，正確に量り，メタノールにて正確に50 mLとし，標準溶液とした。試料溶液および標準溶液20 μ Lにつき，次の条件で液体クロマトグラフ法を行い，EOのピーク面積 A_T 及び A_S を求めた。

EOの量(mg)= EOの秤取量(mg) \times $A_T/A_S \times 1/5000$

操作条件

検出器：紫外吸光度計(測定波長：285 nm)

カラム：内径4.6 mm，長さ25 cmのステンレス管に5 μ mの液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シランを充填する。

カラム温度：35 付近の一定温度

移動相：水/アセトニトリル混液(31:9)

流量：EOの保持時間が約15分になるように調整する。

乳液の場合：乳液約0.5 gを精密に量り，10 mLのメスフラスコに入れ，EO溶液1.0 mLを加え，メタノールにて10 mLとする。この液を共栓遠心分離管に入れ，3000 rpmで5分間遠心分離を行う。得られた上清を試料溶液とする。以下，化粧水の操作法を準用する。

3. 結果および考察

3.1 紫外外部吸収スペクトル

化粧品には，防腐剤としてパラベン類が多用されており，MPとの分離・分析を考える必要がある。そこで，10 μ g/mLのMPあるいはEOのメタノール溶液を調製し，紫外外部吸収スペクトルを測定し，Fig.1に示した。

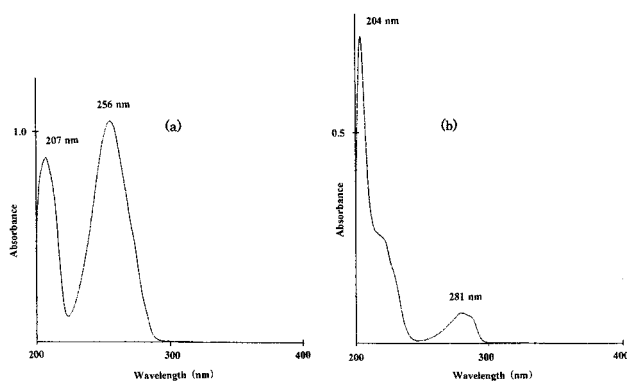


Fig.1 UV spectra for methylparaben (a) and estriol (b) at 10 μ g/mL

Fig.1から分かるようにMPは207及び256 nmに吸収極大波長を，EOは204及び281 nmに吸収極大波長を持つことが分かった。HPLC装置の検出波長を281 nm，285 nm，290 nm及び295 nmと変えたとき，285 nmでのEOのピーク面積を100%とした時，それぞれのピーク面積(%)は112.5%，100.0%，59.3%及び16.6%であった。また，MPのピーク面積は，それぞれ238.4%，100.0%，38.8%及び15.1%であった。厚生省告示第331号の化粧品基準によるパラベン類の配合上限は1.0%¹⁾であることから考え，MPの影響が大きく減少する285 nmを用いることにした。

3.2 アセトニトリルの影響

カラムとして，液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シランを充填したのを用い，移動相の検討を行った。移動相としては，水/アセトニトリル混液の(4:1)~(11:9)を用いて検討した。なお，試験溶液としては，1 mL当たり10 μ gのEO及びMPを含むメタノール溶液を調製し，その20 μ Lを用いて検討した。EO及びMPの保持時間(t_R)の変化をFig.2に示した。

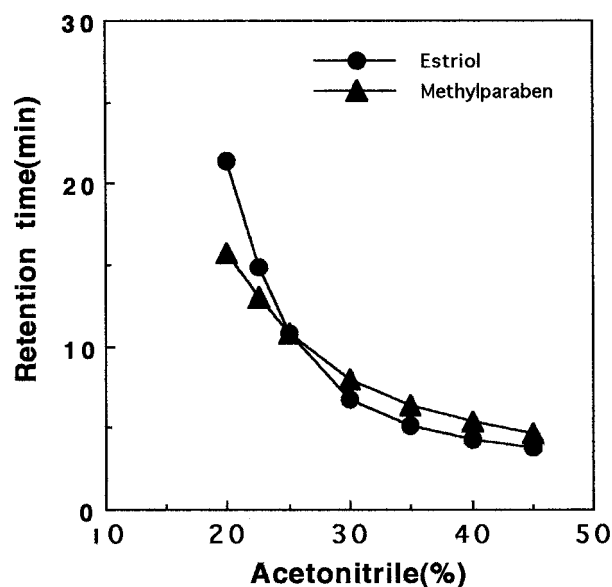


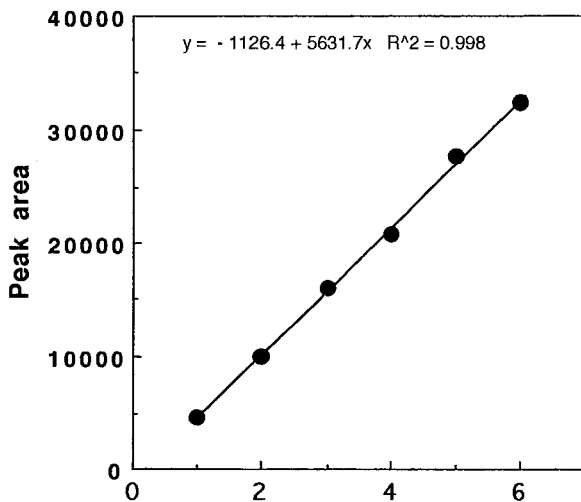
Fig.2 Effect of acetonitrile on retention time of estriol and methylparaben

アセトニトリル濃度が20~45%と上昇するに従い，EOおよびMPの t_R は，それぞれ21.9~3.8分及び15.8~4.7分と減少した。このことより，両者の分離が良好な水/アセトニトリル混液(7:3)を用いることを考えた。しかし，その時のEO及びMPの t_R は，それぞれ6.8分及び8.0分であった。実際の化粧品には，種々の防腐剤が使われており，液体クロマトグラフ用オクタデシルシリル化シランを充填したカラムを用いた場合，MPの保持時間の少し前にフェノ

キシエタノールのピークが出現することが報告されている。⁵⁾そこで、フェノキシエタノール及びMPが共に防腐剤として使われている場合を想定して、別の移動相の条件、水/アセトニトリル混液(31:9)を実際の測定の移動相として考えることにした。水/アセトニトリル混液(31:9)を用いた時のEO及びMPの t_R は、それぞれ、14.9分及び13.0分であった。

3.3 EOの検量線

エストリオール原液の一定量を正確に量り、メタノールで希釈し、1 mL当たりエストリオール1.0~6.0 µgを含有する溶液を調製した。それら溶液の20 µLを用いて検量線の



作成を行い、Fig.3に示した。

Fig.3 Working curve for estriol

Fig.3から分かるように、EO濃度とピーク面積の間には良好な直線関係が成立した。

EO1.0 µg/mL及び5.0 µg/mLを含む溶液20 µLを用い、6回の繰り返し注入を行い、ピーク面積の再現性の検討を行った。EO1.0 µg/mL及び5.0 µg/mLから得られた平均値(相対標準偏差)は、それぞれ、4490(12.5%)及び27288(0.96%)であった。

3.6 化粧品への応用

化粧水B約0.5 gを精密に量り、10 mLのメスフラスコに入れ、EO溶液1.0 mLを加え、メタノールにて10 mLとし、試料溶液とした。同様に、乳液C約0.5 gを精密に量り、10 mLのメスフラスコに入れ、EO溶液1.0 mLを加え、メタノールにて10 mLとした。この液を共栓遠心分離管に入れ、3000 rpmで5分間遠心分離した後、上清を試料溶液とした。この液20 µLを用いてHPLC測定を行った。その結果をFig.4に示した。

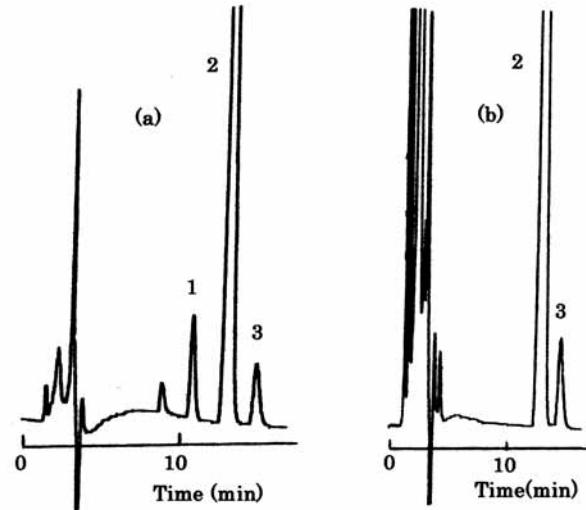


Fig.4 HPLC Chromatograms of Lotion B(a) and Milky Lotion D(b) 1: phenoxyethanol, 2: MP, 3: EO

Fig.4aから分かるように、化粧水Bには、フェノキシエタノールおよびMPが添加されていることが分かった。また、Fig.4bから分かるように、乳液C中には、MPが防腐剤として添加されていることが分かった。化粧水A及び乳液Dのクロマトグラムは示さなかったが、共にそれらに含有されている賦形剤はEOの分析に影響を与えなかった。

化粧水AおよびB並びに乳液CおよびDにEOの5.0 µg/mLを添加した時の測定結果をTable 1に示した。Table 1から分かるように、化粧水AおよびBあるいは乳液CおよびDに0.01%相当量のEOを添加した時のEOの回収率は、それぞれ、102.1%、101.5%、106.3%及び100.5%であり、今回確立した液体クロマトグラフ法により十分に分離確認し、定量出来ることが明らかになった。

Table 1 Recoveries(%) of estriol from cosmetics

	Lotion A	Lotion B	Milky lotion C	Milky lotion D
No. 1	102.7	102.5	106.3	100.0
No. 2	103.3	103.0	106.0	101.2
No. 3	100.2	99.1	106.5	100.2
average	102.1	101.5	106.3	100.5
R.S.D(%)	1.61	2.09	0.24	0.64

文献

- 1) Notification No.331 dated on September 29, 2000
- 2) Ying Y.Y, Kookana R.S.: J. Environ. Sci. Health B., 37, 225-234(2002)
- 3) Tagawa N., Tsuruta H., Fujinami A., Kobayashi Y.: J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl., 19, 39-45(1999)
- 4) Gatti R., Gioia M.D., Di Pietra A.M., Cavrini V.: J. Pharm. Biomed. Anal., 18, 187-192(1998)
- 5) Tokunaga H., Takeuchi O., Ko R., Uchino T., Ando M.: *Eiken Zasshi*, 121, 25-29(2003)