

化粧品に配合が制限されている成分の分析法に関する研究 ：安息香酸ナトリウム

徳永裕司, 森 謙一郎*¹, 野坂富雄*², 土井佳代*³, 坂口 洋*⁴, 藤井まき子*⁵,
高野勝弘*⁶, 林 正人*⁷, 吉沢賢一*⁸, 島村公雄*⁹, 佐藤信夫*¹⁰

Studies for analyzing the restricted ingredients such as sodium benzoate

Hiroshi Tokunaga, Kenichiro Mori*¹, Tomio Nosaka*², Kayo Doi*³, Hiroshi Sakaguchi*⁴, Makiko Fujii*⁵,
Katuhiro Takano*⁶, Masato Hayashi*⁷, Kenichi Yoshizawa*⁸, Kimio Shimamura*⁹, Nobuo Sato*¹⁰

Sodium benzoate is a kind of preservatives in cosmetics and is nominated as the restricted ingredients in cosmetics in Japanese Pharmaceutical Affairs Act. So the analytical method for sodium benzoate was investigated by HPLC. After adding 5 ml of tetrahydrofuran to 0.05 g of the lotions or creams with 0.1 or 1.0 % sodium benzoate and dissolving them, that mixture was made up to 50 ml with methanol. If necessary, the mixture was filtrated with a membrane filter (0.45 μ m). The testing solution of 20 μ l was analyzed by HPLC using the ODS column (CAPCELL PAK C₁₈ column, 4.6x250 mm), the mixture of 50 mmol/l phosphate buffer(pH5.5) and acetonitrile (7:3) and the detection wavelength of 227nm. The working curve from 1.0 to 12.0 μ g/ml showed a linear line between the concentrations of sodium benzoate and the peak area. There was no interference of peak of sodium benzoate from the lotion and cream.

Key Words: sodium benzoate, preservatives, Japanese Pharmaceutical Affairs Act, lotion, cream

1. 緒 言

平成 13 年 4 月 1 日より,化粧品の承認・許可に当たって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³⁾に化粧品に使用することのできる防腐剤が定められている。この中で安息香酸ナトリウム(SB)は化粧品 100 g 中に 1g まで使用することが認められている。食品中の SB およびソルビン酸カリウムの液体クロマトグラフ法²⁾, 口腔トニック中の水溶性ビタミン,カフェインおよび防腐剤の液体クロマトグラフ法³⁾, 去痰剤中の dextromethorphan hydrobromide, guaifenesin および SB 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,化粧品に使用が認められている SB の化

粧水およびクリーム中での分析法として 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-10AXL 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。SB 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

SB,フェノキシエタノール(PE)およびメチルパラベン(MP)は和光純薬製のものを用いた。液体クロマトグラフ用カラムの CAPCELL PAK C₁₈ は資生堂より購入した。化粧水およびクリームは SB 1.0% および 0.1% を含む製品をカネボウ株式会社で試作し,試験に供した。

SB 標準溶液:SB 25.0 mg を水に溶かし 50.0 mL とした。(0.5 mg/mL)

PE 標準溶液:PE 25.0 mg を水に溶かし,正確に 50.0 mL とした。この液 2 mL を正確に量り,水を加えて正確に 100 mL とした。(10 μ g/mL)

脚注

#脚注: To whom correspondence should be addressed: Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo, 158-8501, Japan: Tel:03-3700-1141 ext.253; Fax: 03-3700-9291; E-mail: tokunaga@nihs.go.jp

*¹東京都衛生研究所,*²埼玉県衛生研究所,*³神奈川県衛生研究所,*⁴北里大理学部,*⁵昭和薬科大学,*⁶日本化粧品工業連合会,*⁷資生堂リサーチセンター,*⁸ポーラ化成工業(株)中央研究所,*⁹カネボウ化粧品(株)化粧品研究所,*¹⁰コーセー(株)研究本部

MP 標準溶液 : MP25.0 mg を水に溶かし , 正確に 50.0 mL とした . この液 2mL を正確に量り , 水を加えて正確に 100mL とした . (10 μ g/mL)

リン酸水素二ナトリウム試液 : リン酸水素二ナトリウム 7.10 g を水 1000 mL に溶かした . (50 mmol/L)

リン酸二水素カリウム試液 : リン酸二水素カリウム 6.80 g を水 1000 mL に溶かした . (50 mmol/L)

50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 5.5) : リン酸二水素カリウム試液 500 mL にリン酸水素二ナトリウム試液を加え , pH を 5.5 に調整した .

2.3 定量法

試料約 0.05 g を精密にはかり , テトラヒドロフラン 5 mL に溶かし , メタノールを加えて 50.0 mL とする . 不溶物がある場合は , さらにメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過を行い , これを試験溶液とする . 試験溶液 20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し , 得られたクロマトグラムのピーク面積をはかり , 別に作成した検量線から試験溶液中の安息香酸ナトリウムの濃度 A (μ g/mL) を求め , 次式により試料 100 g 中の含有量を算出した .

$$\text{試料 100 g 中の安息香酸ナトリウム含有量 (mg)} = (A \times 50) / \text{試料採取量} \times 1/10$$

検量線の作成 : SB 標準溶液をメタノールで希釈し , 1 mL 当たり SB5.0 , 10.0 および 15.0 μ g を含む標準系列をつくり , 各 20 μ L を高速液体クロマトグラフに注入し , 得られたそれぞれのピーク面積と濃度から検量線を作成した .

操作条件

検出器 : 紫外吸光度計 (測定波長 : 227 nm)

カラム : CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 x 250 mm)

移動相 : 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH 5.5) / アセトニトリル混液 (97:3)

カラム温度 : 35 付近の一定温度

流量 : 1 mL/min

3. 結果および考察

検討に用いた試料溶液は , SB 標準溶液の一定量を水で希釈し , 1 mL 当たり 10 μ g の濃度に調製し , 試料溶液とした .

3.1 紫外外部吸収スペクトル

試料溶液を用いて紫外吸収スペクトルを測定し , その結果を Fig.1 に示した .

測定した SB の吸収極大波長は 227nm であった . この波長を検出波長とすることにした .

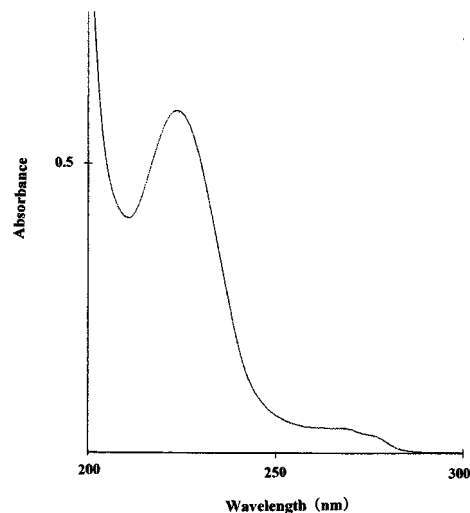


Fig.1 UV spectrum for sodium benzoate at 10 μ g/ml

3.2 アセトニトリルの影響

以下の液体クロマトグラフ法での条件検討では , 試料溶液 20 μ L を用いた .

移動相として 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH6.0) / アセトニトリル混液 (100:0) ~ (95:5) を用い , アセトニトリルの影響について検討した . その結果を Fig.2 に示した .

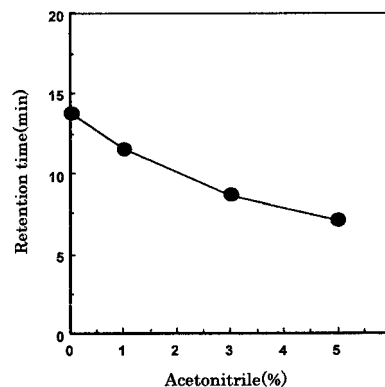


Fig.2 Effect of acetonitrile on retention time of sodium benzoate

Fig.2に示したように 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH6.0) / アセトニトリル混液 (100:0) ~ (95:5) を用いた時 , SB の保持時間 (t_R) は 13.7 ~ 7.1 分に变化した . この結果より , t_R 8.7 分を示した 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH6.0) / アセトニトリル混液 (97:3) を用いることにした .

3.2 pH の影響

50 mmol/L リン酸塩緩衝液 / アセトニトリル混液 (97:3) に用いられているリン酸塩緩衝液の pH を 4.5 ~ 7.0 に变化さ

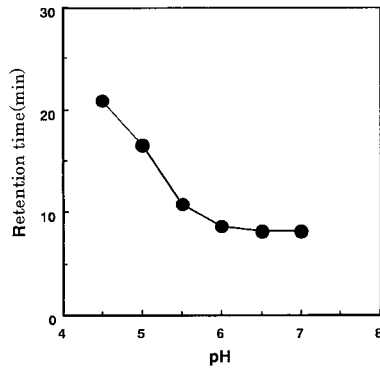


Fig.3 Effect of pH of the mobile phase on retention time of sodium benzoate

せて検討し，その結果を Fig.3 に示した．

リン酸塩緩衝液の pH が 4.5 ~ 6.0 に変化するに従い， t_R は 21.0 ~ 8.7 分に变化した．しかし，pH が 6.0 ~ 7.0 では， t_R はほとんど変化しなかった．これらの結果より，50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH7.0) / アセトニトリル混液 (97:3) を用いることを考えたが，クリーム中の SB の測定に応用したとき，クリームの溶解に用いたテトラヒドロフランに由来するピークが安息香酸のピークと一致した．そこで，化粧水およびクリームの測定には 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH5.5) / アセトニトリル混液 (97:3) を用いることにした．

3.3 リン酸塩緩衝液のイオン強度及びカラム温度

リン酸塩緩衝液のイオン強度を 25 ~ 100 mmol/L に変化させた．安息香酸の保持時間はほとんど変化がなかった．また，カラム温度を 25 ~ 40 に変化させた．保持時間は僅かに低下した．この結果より 50 mmol/L リン酸塩緩衝液 (pH5.5) / アセトニトリル混液 (97:3) 及び 35 を用いることにした

3.4 SB のクロマトグラムおよび検量線

1% の SB を含有するクリームを用い，2.3 の定量法で調製した試料溶液を用い，HPLC の操作条件で得られたクロマトグラムを Fig.4 に示した．

Fig.4 から分かるように，今回検討した SB は試作したクリーム中の成分の影響もなく測定できることが明らかになった．クロマトグラムを示さなかったが，化粧水の場合にも同様の結果を得た．

SB の 1.0 ~ 12.0 $\mu\text{g/mL}$ を含む溶液を調製し，この液 20 μl を用い，検量線を作成した．得られた回帰一次方程式は $y=5.082 \times 10^4 x + 2962$ ($r^2=0.997$) であった．SB 濃度とピーク面積の間には良好な直線関係が成立した．SB 1.0 $\mu\text{g/mL}$ 及び 10.0 $\mu\text{g/mL}$ の溶液 20 μL を用い，6 回の繰り返し注入を行い，そのピーク面積を求めた．それらの平均値は，それぞれ 51552 及び 502353 であり，それらの相対標準偏差は 4.30 及び 0.62% であった．

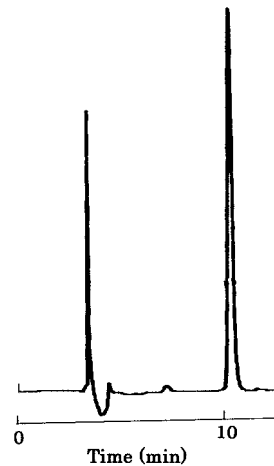


Fig.4. HPLC chromatogram for a cream containing 1.0% sodium benzoate

化粧品には防腐剤として，PE および MP が一般に用いられている．PE および MP との分離を考え，PE および MP の標準溶液 20 μL を用いて検討した．PE および MP の保持時間は，それぞれ，約 20 分および約 44 分であった．

3.5 化粧品への応用

クリームの場合，基材から SB を完全にメタノール，エタノールで溶媒抽出することは困難である．そこで，一定量のクリームを 5 mL のテトラヒドロフランに溶かし，次に，メタノールで一定濃度にして測定することを検討した．1.0% の SB を含むクリーム 0.5g を 5 mL テトラヒドロフランに溶かし，メタノールで正確に 50.0 mL にメスアップした．この液 5.0 mL を正確に量り，メタノールにて正確に 50.0 mL とし，試料溶液にした．この液 20 μL を用い，液体クロマトグラフ法を行った．6 回の繰返実験から得られた回収率の平均値および RSD (%) は，それぞれ 87.7% および 2.68% であった．次に，1.0% の SB を含むクリーム 0.05g を 5 mL テトラヒドロフランに懸濁させ，メタノールで正確に 50.0 mL にメスアップし，試料溶液にした．この液 20 μL を用い，液体クロマトグラフ法を行った．6 回の繰返実験から得られた回収率の平均値および RSD (%) は，それぞれ 102.6% および 1.46% であった．この結果より，クリーム 0.05g を用いた 2.3 の定量法を確立した．

試作した 1.0% および 0.1% の SB を含む化粧水およびクリームを用い 2.3 の定量法で操作したときに得られた測定結果を Table 1-1 ~ 1-4 に示した．

Table 1-1 ~ 1-4 から分かるように化粧水およびクリーム中の SB は今回確立した測定法で十分に測定できることが明らかになった．

Table 1-1 Amount of sodium benzoate in the lotion containing 1.0% sodium benzoate

	weight (mg)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)
St. solution	25.1	563413	563413	563413	
Lotion 1	500.3	564456	569415	566936	1.002
Lotion 2	503.9	600885	581624	591255	1.037
Lotion 3	499.1	594498	591126	592812	1.050
Lotion 4	504.7	583425	587667	585546	1.026
Lotion 5	502.8	568449	582767	575608	1.012
Lotion 6	496.9	586673	582810	584742	1.040
				mean	1.028
				R.S.D (%)	1.78

文献

- 1) Notification No.331 dated on September 9, 2000
- 2) Pylypiw H.M Jr., Grether M.T.: J.Chromatogr., 23, 299-304(2000)
- 3) Maeda Y., Yamamoto M., Owada K., Sato S., Masui T., Nakazawa H.: J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72, 244-247(1989)
- 4) Chen T.M., Pacifico J.R., Daly R.E.: J. Chromatogr. Sci., 26, 636-639(1988)

Table 1-2 Amount of sodium benzoate in the lotion containing 0.1% sodium benzoate

	weight (mg)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)
St. solution	25.1	531536	540374	535955	
Lotion 1	502.9	50387	49492	49940	0.092
Lotion 2	500.4	52032	51457	51745	0.096
Lotion 3	497.6	49957	48834	49396	0.092
Lotion 4	501.2	50141	51456	50799	0.094
Lotion 5	504.3	47252	50512	48882	0.090
Lotion 6	501.4	51319	50486	50903	0.094
				mean	0.093
				R.S.D (%)	2.26

Table 1-3 Amount of sodium benzoate in the cream containing 1.0% sodium benzoate

	weight (mg)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)
St. solution	25.1	570333	573830	572082	
Lotion 1	49.8	581880	582696	582288	1.018
Lotion 2	49.5	578832	576799	577816	1.016
Lotion 3	50.3	589375	588104	588740	1.019
Lotion 4	49.1	572892	569956	571424	1.013
Lotion 5	50.0	597570	604918	601244	1.047
Lotion 6	49.2	588206	589751	588979	1.042
				mean	1.026
				R.S.D (%)	1.46

Table 1-4 Amount of sodium benzoate in the cream containing 0.1% sodium benzoate

	weight (mg)	Peak area 1	Peak area 2	average	amount (%)
St. solution	25.1	531536	540374	535955	
Lotion 1	494.4	50442	51146	50794	0.095
Lotion 2	496.3	49543	49728	49636	0.093
Lotion 3	500.9	52024	52437	52231	0.097
Lotion 4	500.8	54619	53666	54143	0.100
Lotion 5	504.4	54951	55335	55143	0.102
Lotion 6	502.4	52210	52434	52322	0.097
				mean	0.097
				R.S.D (%)	3.29