

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品中の防腐剤クロルフェネシンの定量

五十嵐良明[#], 宮澤法政^{*1}, 島村公雄^{*2}, 佐藤信夫^{*3}, 吉沢賢一^{*4}, 林 正人^{*5},
高野勝弘^{*6}, 宮本道子^{*7}, 小島 尚^{*8}, 坂口 洋^{*9}, 藤井まき子^{*10}

Detection of the Preservative Chlorphenesin in Cosmetics by High-performance Liquid Chromatography

Yoshiaki Ikarashi[#], Norimasa Miyazawa^{*1}, Kimio Shimamura^{*2}, Nobuo Sato^{*3}, Ken-ichi Yoshizawa^{*4}, Masahito Hayashi^{*5},
Katsuhiro Takano^{*6}, Michiko Miyamoto^{*7}, Takashi Kojima^{*8}, Hiroshi Sakaguchi^{*9} and Makiko Fujii^{*10}

A simple determination method for preservative chlorphenesin in cosmetics was developed. Cosmetic samples were dissolved in methanol. The sample solution was analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with ODS column, using water-methanol (55:45) or water-acetonitrile (3:1) adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid as the mobile phase. Chlorphenesin was detected with ultraviolet light detection at 280 nm. A linear relation was obtained between the peak areas and the concentrations of chlorphenesin in the range of 1–500 µg/ml. The determination limit of chlorphenesin was 1–2 µg/ml. Recoveries of chlorphenesin spiked in lotion and milky lotion at the levels of 0.03% and 0.3% were 98.8–100.0%. This method was applied for cosmetics including 0.03% and 0.3% of chlorphenesin and their content corresponded with the determined values.

Keywords: preservative, chlorphenesin, cosmetics, determination, HPLC

諸言

クロルフェネシン[chlorphenesin, 3-(4-chlorophenoxy)-1,2-propanediol, CP, C₉H₁₁ClO₃, 分子量202.63]はFig. 1に示す化学構造式で、化粧品の防腐剤として用いられる成分である。クロルフェネシンは、化粧品基準（厚生省告示平成12年9月29日第331号）において、粘膜に使用されることがない化粧品のうち洗い流すもの、及び粘膜に使用されることがない化粧品のうち洗い流さないものに対して、100 g中に0.3 g以下の配合が認められている¹⁾。防腐剤の種類や量については最も違反例の多い項目であり、時代や化粧品の種類とともに使用される物質も変化している。現在最もよく使用される防腐剤は、パラベン類と呼ばれる*p*-ヒドロキシ安息香酸エステル類であるが、クロルフェネシンも651製品中14品に使用されていることが東京都の調査でわかっている²⁾。

日本薬学会衛生試験法・注解には種々の防腐剤の試験法が記載されているが、クロルフェネシンの試験法は記載されていない³⁾。クロルフェネシンの分析法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC)²⁾やガスクロマトグラフィー⁴⁾を用いた方法が報告されている。前者の

HPLCによる方法は、化粧品中の防腐剤を一斉分析することを目的としたため、7種もの試薬及び溶媒を混合した複雑な組成の移動相を用いている²⁾。そこで今回、簡便なクロルフェネシンの試験法として、単純な組成の移動相を用いたHPLC法を開発することとした。

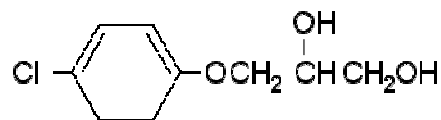


Fig. 1. Chemical structure of chlorphenesin

実験方法

1. 試薬

クロルフェネシンはSigma-Aldrich社から購入した。クロルフェネシン約0.1 gを精密にはかり、メタノールに溶かして正確に100 mlとしたものをクロルフェネシン標準原液とした。この原液をメタノールで希釈して、10～200 µg/mlのクロルフェネシン標準溶液を調製した。*p*-ヒドロキシ安息香酸メチル（メチルパラベン）、*p*-ヒドロキシ安息香酸エチル（エチルパラベン）、フェノキシエタノール及びデヒドロ酢酸ナトリウムはメタノールに溶解して、約1.0 mg/mlの各標準原液を調製した。これら4種の標準原液のうち3種またはすべてとクロルフェネ

[#] To whom correspondence should be addressed:

Yoshiaki Ikarashi; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo 158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141 ext.255, Fax: 03-3707-6950; E-mail: ikarashi@nihs.go.jp

シン標準原液を混合し、メタノールで希釈して、各100 µg/mlの混合標準溶液を調製した。アセトニトリル及びメタノールは市販のHPLC用を用いた。

2. 試料

クロルフェネシンを無配合、あるいは0.03または0.3%配合して製剤した化粧水及び乳液を検討に用いた。

3. 器具及び装置

高速液体クロマトグラフは、島津製作所製LC-10_{VP}またはAgilent社製1100システムを用いた。

メンブランフィルターは、Millipore社製Millex-LCR（孔径0.45 µm, 直径13 mm, PTFE膜）を用いた。

4. 試験操作

4.1 試験溶液の調製

試料約1 gを精密にはかり、メタノールを加えて約10分間超音波処理して分散または溶解したのち、メタノールを加えて正確に10 mlとした。完全に溶解しないときはメタノールの容量を20～100 mlとした。この溶液をメンブランフィルターでろ過したものを試験溶液とした。ろ過が不十分な場合は、3000 rpmで10分間遠心し、上清を試験溶液とした。

4.2 定量

試料溶液10 µlをHPLCに注入し、得られたクロマトグラム上のクロルフェネシンのピーク面積を求め、別に、クロルフェネシン標準溶液（10～200 µg/ml）を用いて作成した検量線から、試験溶液中の濃度（µg/ml）を求め、試料中の含有量（%）を算出した。

HPLC条件

カラム：TSKgel ODS-80T_M（東ソー（株））、CAPCELL PAK C18 UG120（（株）資生堂）、またはInertsil ODS-3（ジーエルサイエンス（株））。いずれも4.6 mm i.d.×150 mm, 粒径5 µm

カラム温度：40°C

移動相：水・メタノール（55:45）、または水・アセトニトリル（3:1）をリン酸でpH 2.5に調整したもの

流速：1.0 ml/min

検出器：フォトダイオードアレイ検出器（280 nm）

結果と考察

1. 測定波長の検討

クロルフェネシン-メタノール溶液の紫外可視吸収スペクトルをFig. 2に示した。クロルフェネシンは228 nm及び280 nmに吸収極大を示した。HPLCの測定波長としては280 nmの方が特異性が高く適切と思われる。ただし、試験溶液中のクロルフェネシン量が少ない場合は、

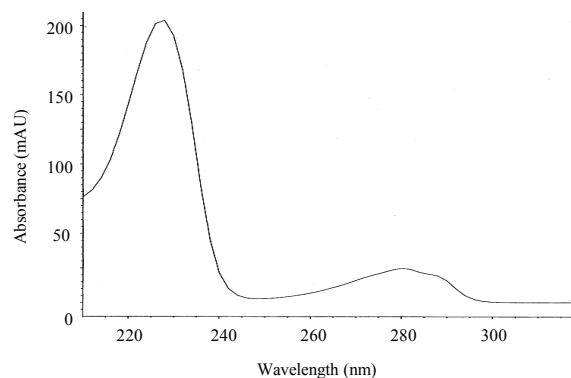


Fig. 2. Ultraviolet absorption spectrum of chlorphenesin (1000 µg/ml in methanol)

228 nmを検出波長とすることによって低濃度まで測定が可能と考えられた。

2. HPLC条件の検討

化粧品には、防腐剤としてクロルフェネシン以外にメチルパラベン、エチルパラベン、フェノキシエタノール、デヒドロ酢酸ナトリウムなどが汎用される。そのため、クロルフェネシンの定量にはこれら物質との分離分析が必要である。そこで、各物質を100 µg/ml含む混合標準溶液を用い、クロルフェネシンが分離、定量可能なHPLC条件を検討した。クロルフェネシンの保持時間は、カラムに一般的なODSカラムであるTSKgel ODS-80T_Mを、移動相として水・メタノール混液を用いた場合、液比50:50では約6分、55:45では約10分、60:40では約20分であった。ここでは、クロルフェネシンの保持時間が10分程度となるよう、移動相は水・メタノール（55:45）混液とした。本条件でメチルパラベンの保持時間は約7分、エチルパラベンは約12分と、クロルフェネシンと良好に分離した（Fig. 3）。カラムとして別のODSカラムであるCAPCELL PAK C18 UG120を用いた場合、クロルフェネシンの保持時間は約7.5分とやや早くなったが他の物質との分離に問題はなかった。

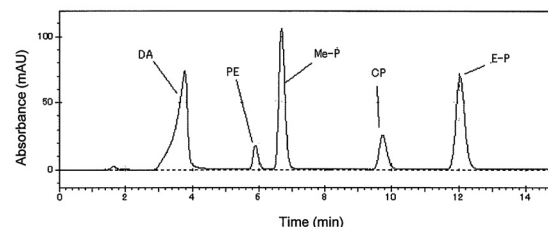


Fig. 3. HPLC chromatograms of preservatives

DA: dehydroacetic acid, PE: phenoxyethanol, Me-P: methyl *p*-hydroxybenzoate, CP: chlorphenesin, E-P: ethyl *p*-hydroxybenzoate.

HPLC column: TSK gel ODS-80T_M (4.6 mm i.d. × 150 mm), column temperature: 40°C, mobile phase: water-methanol (55:45), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 280 nm, injection volume: 10 µl.

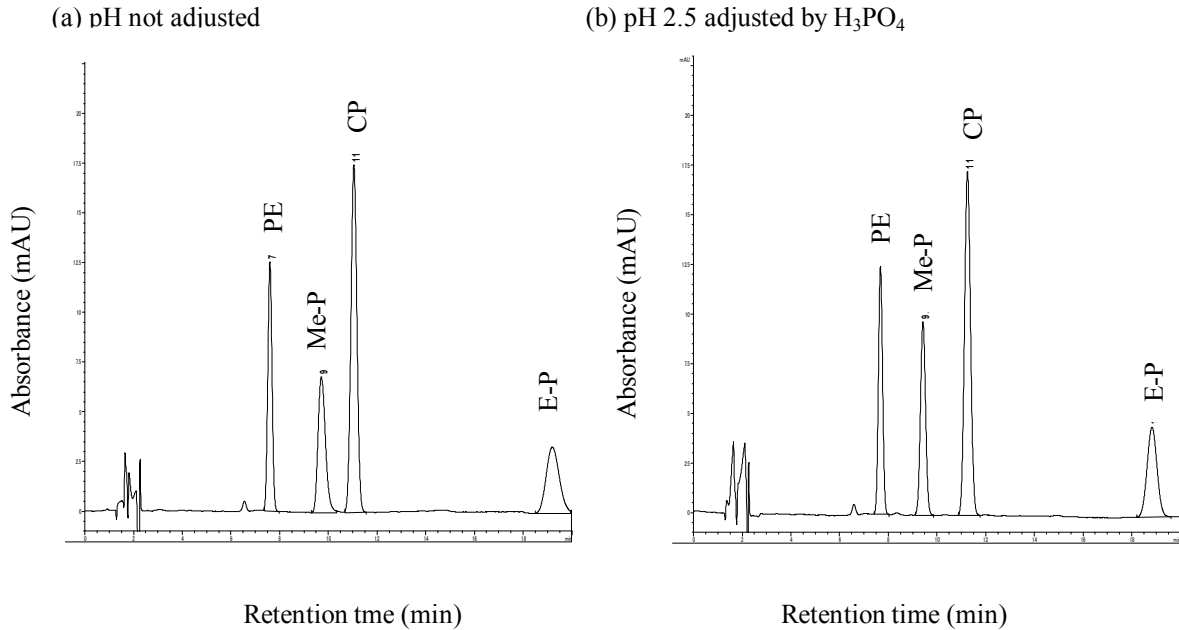


Fig. 4. Effect of pH on the HPLC chromatogram of preservatives

PE: phenoxyethanol, Me-P: methyl *p*-hydroxybenzoate, CP: chlorphenesin, E-P: ethyl *p*-hydroxybenzoate.

HPLC column: Inertsil ODS-3 (4.6 mm i.d. × 150 mm), column temperature: 40°C, mobile phase: water-acetonitrile (3:1), flow rate: 1.0 ml/min, detection wavelength: 280 nm, injection volume: 10 μl.

さらに水・アセトニトリル混液の移動相についても検討した。TSKgel ODS-80T_Mカラムで、水・アセトニトリル (4:1) 混液におけるクロルフェネシンの保持時間は約8分、3:1混液では約14分、7:3混液では約18分であった。そのため、水・アセトニトリル比は、水・メタノール混液を用いたときの保持時間とほぼ同じとなるよう3:1とした。カラムにInertsil ODS-3を使用した場合、クロルフェネシンの保持時間は約11分となったが、テーリングするメチルパラベンとの分離が若干良くなかった。そこで、移動相にリン酸を加えpH2.5と酸性にした結果、分離度は3.8と良くなった (Fig. 4)。

以上のことから、カラムとしては種々のメーカーのODSカラムが、移動相としては水・メタノール混液、あるいは水・アセトニトリル混液を用いることができることがわかった。また、水・アセトニトリル混液の場合には酸性にすることで、クロルフェネシンとメチルパラベンとの分離が改善されることがわかった。

3. 検量線及び定量限界

カラムにTSKgel ODS-80T_M、移動相に水・メタノール (55:45) 混液を用いた場合のクロルフェネシンの検量線をFig. 5に示した。いずれのカラム及び移動相を用いても、クロルフェネシンは1 ~ 500 μg/mlの濃度範囲でピーク面積との間に良好な直線性が認められた ($r^2 = 0.9995$)。また、定量限界濃度は1 ~ 2 μg/mlであった。

4. 添加回収試験

クロルフェネシン無配合の化粧水及び乳液1.0 gにクロルフェネシンを約300 μg添加し、試験法に従って操作した。添加したクロルフェネシンは、化粧水、乳液から良好に回収された (Table 1)。

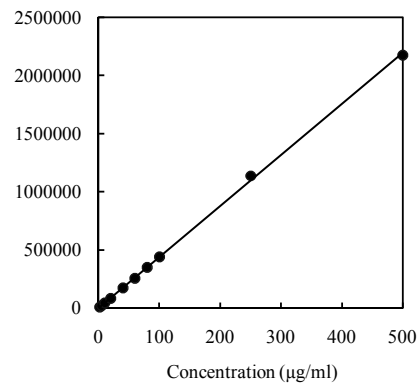


Fig. 5. Calibration curve of chlorphenesin

Table 1. Recovery of chlorphenesin added to lotion and milky lotion

Sample	Chlorphenesin	
	Added (μg)	Recovery (%)
Milky lotion	317.1	98.8 ± 0.3
Lotion	308.1	100.0 ± 0.8

Each value was the mean ± standard deviation of six experiments.

5. クロルフェネシン配合試料の定量

一定量のクロルフェネシンを配合して製剤した化粧水及び乳液を定量することで本試験法の精度を確認した。代表的な試料のクロマトグラムをFig. 6に、定量結果をTable 2に示した。いずれの試料ともクロマトグラム上でクロルフェネシンに重なるピークはなく、定量値もほぼ配合量の値と一致した。化粧水に比べると乳液に若干のばらつきが見られたが、問題のないレベルであった。

Table 2. Determination of chlorphenesin in lotion and milky lotion

Sample	Chlorphenesin	
	Content (%)	Determined (%)
Lotion	0	ND
	0.03	0.030 ± 0.000
	0.30	0.299 ± 0.001
Milky lotion	0	ND
	0.03	0.031 ± 0.000
	0.30	0.300 ± 0.003

ND: <0.001%.

Each value was the mean ± standard deviation of six experiments.

文献

- 1) Ministry of Health, Labour and Welfare Notification No.465 of October 2005
- 2) Mori, K., Nakamura, Y., Ohnuki, N., Terajima, K., Miyamoto, M., Ogino, S. and Saito, K.: *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. P.H.*, **58**, 103-106 (2007)
- 3) "Method of Analysis in Health Science 2005," eds. By the Pharmaceutical Society of Japan, Kanehara & Co., Ltd., Tokyo, Japan (2005)
- 4) Douglas, J. F., Stockage, J. A. and Smith, N. B.: Gas chromatographic determination of chlorphenesin in plasma. *J. Pharm. Sci.*, **59**, 107-108 (2006)

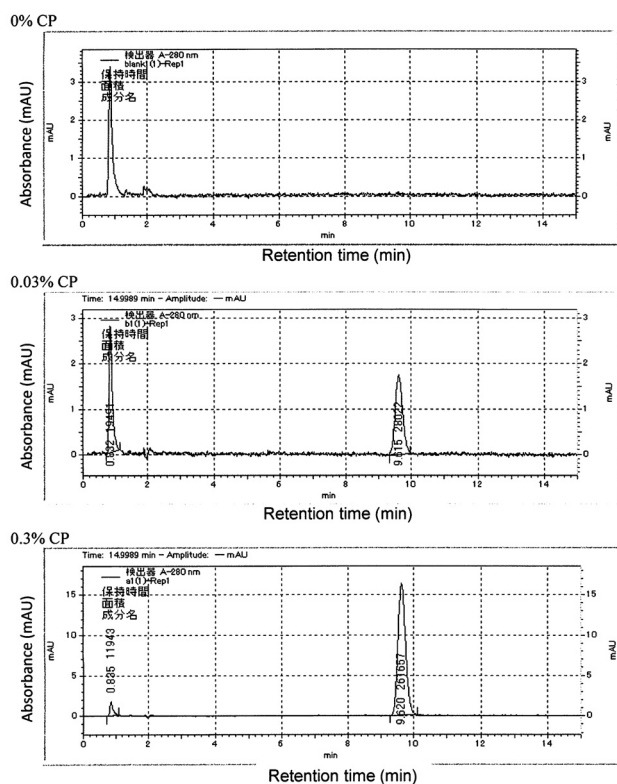


Fig. 6. HPLC chromatograms of milky lotions containing chlorphenesin (CP)

The HPLC conditions have been described in Fig. 3.