

化粧品中安息香酸デナトニウムの分析と誤飲防止効果

森 謙 一 郎*, 中 村 義 昭*, 大 貫 奈 穂 美*, 寺 島 潔*,
横 山 敏 郎*, 宮 本 道 子*, 荻 野 周 三*, 齊 藤 和 夫*

Determination of Denatonium Benzoate in Cosmetics and their Antifeeding Property

Ken'ichiro MORI*, Yoshiaki NAKAMURA*, Nahomi OHNUKI*, Kiyoshi TERASHIMA*,
Toshiro YOKOYAMA*, Michiko MIYAMOTO*, Shuzo OGINO* and Kazuo SAITO*

A method for the determination of denatonium benzoate, benzyldiethyl-*N*-2,6-xylylcarbamoylmethylammonium benzoate, abbreviated to DB, in cosmetics was developed. A cosmetic sample of 1-2 g was weighed and dissolved with methanol up to a volume of 10 mL. When a precipitate was seen, it was cleared using a high speed centrifuge. The solution was loaded on a cation exchange column, washed with methanol, and eluted by 1 %HCl-MeOH 10 mL. The eluate was evaporated to dryness, dissolved by 0.1 %HCl-MeOH 500 μ L, and injected on an HPLC. The conditions for HPLC were as follows: column : ODS, mobile phase : water · acetonitrile (3 : 7), containing 0.01 mol/L sodium 1-pentanesulfonate, 0.015 mol/L sodium sulfate, injection volume : 20 μ L, detector : 206 nm. The detection limit was 0.1 ppm. By this method, 1.0 to 9,000 ppm of DB were detected in five imported cosmetics without any interference. A 1.0 mL of 1.0 ppm DB water solution fully convinced us of DB's antifeeding property because of the intense bitter taste. We have rarely seen Japanese cosmetics or household articles containing DB as aversive agents to prevent accidental ingestion, but there are many and wide ranges in US or European articles.

Keywords : 化粧品 cosmetics, 安息香酸デナトニウム denatonium benzoate, 誤飲防止剤 aversive agents to prevent accidental ingestion, 摂食阻害効果 antifeeding property, 忌避剤 repellents, 液体クロマトグラフィー HPLC

結 言

子供にとって母親の化粧する姿は見慣れた情景である。そして母親が食べているかのように見える甘い匂いの化粧品を子供が美味しそうに思うのに不思議はない。日本中毒情報センターの2005年の調べ¹⁾によると、5歳以下の子供で誤飲の多い事故品は、1位 化粧品、2位 たばこ関連品、3位 洗剤、4位 文具美術工芸品、5位 乾燥剤・鮮度保持剤である。また Table 1 に示すように、食用フレーバーを添加した美味しそうな国産化粧品が近年目立っている。これらの製品は特に誤飲対策されていない。誤飲防止剤としては、世界最強の苦味物質である安息香酸デナトニウム²⁾ (denatonium benzoate, benzyldiethyl-*N*-2,6-xylylcarbamoylmethylammonium benzoate, DB) 及びサッカリンデナトニウム⁴⁾ (denatonium saccharide, DS) が知られている。DBの化学構造式をFig. 1 に示したが、4級アンモニウムの安息香酸塩である。DSはこの安息香酸を人工甘味料のサッカリンに換えたものでDBの4~5倍苦い⁴⁾とされているが、市場流通しているのは主にDBである。

Table 1. Japanese Cosmetics Contained Food Flavor, Unprevented Accidental Ingestion

Sample	Food flavor
Bath preparations	Apple
Bath preparations	Orange
Face pack	Chocolate
Heel cream	Papaya
Nail enamel	Strawberry
Shampoo	Apple
Shampoo	Citrus
Soap	Peach

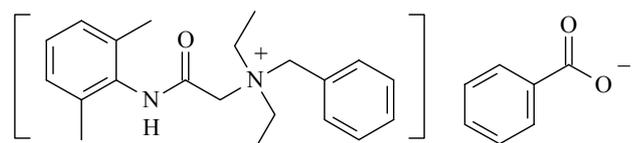


Fig. 1. Chemical Structure of Denatonium Benzoate (DB)

* 東京都健康安全研究センター医薬品部微量分析研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

しかしながらこのBDは国内ではアルコール変性剤としての使用が知られている以外、医薬部外品、化粧品、家庭用品への添加された例は見当たらない。そこでDBの化粧品誤飲防止剤としての適用の可否について検討した。また本研究実施にあたり、化粧品中DBのHPLCによる分析法を検討した。DBの分析報告はいくつかあるが、化粧品からの直接分析法⁵⁾は蒸雑ピークにより感度が得られず、固相抽出法⁶⁾、直接導入質量分析法⁷⁾は多様な化粧品試料には不適であった。今回簡便なディスポーザブルのカチオン交換カラムを用いたところ良好な分析法を作製できた。これにより海外流通製品の含量を測定して実態を調査した。

実験の部

1. 試薬、器具及び装置

DB, アセトニトリル, トリエチルアミン: 和光純薬工業(株)製 試薬特級品. DB標準溶液: DBを塩酸 0.1%含有メタノールで希釈し, 2.5, 5.0, 10.0 及び 20.0ppm溶液とした. カチオン交換カラム: バリアン社製MEGA BE-SCX 6MLをあらかじめメタノール 20 mLで洗浄したもの. フィルター付きクロマトグラフ用試料管: Whatman社製Mini Uni-Prep. 液体クロマトグラフ: 日本分光(株)製ガリバー, フォトダイオードアレイ検出器: 日本分光(株)製MD-915型,

2. 試料

平成16年9月から平成18年6月にインターネットで購入したDB配合表示のある輸入化粧品等5品目を用いた。

3. 分析操作

1) 試料溶液の調製 試料約1~2 gを精密に量り, メタノールを加え約 10 mLとし, 超音波浴で15分間分散した. 沈殿物がある場合は遠心分離器を用いて15,000 rpm, 10分間遠心分離して上澄液を用いた. この溶液全量または一定量をカチオン交換カラムに負荷し, メタノール 20 mLで洗浄後, 1% HCl-MeOH 10 mLで溶出した. 溶出液は 100 mLフラスコにとり, メタノール 50 mLを加え, 50℃の水浴にてロータリーエバポレーターで蒸発乾固, さらにメタノール 50 mLを加えて再度乾固して塩酸を除去した. ついで, 0.1% HCl-MeOH 5 mLで 10 mLフラスコに洗い込み, 蒸発乾固した. これに 0.1% HCl-MeOH 500 μ Lを入れ, フラスコ内壁を十分に洗い込み, フィルター付きクロマトグラフ用試料管に移し, フィルターろ過して試料溶液とした.

2) 定量分析操作 試料溶液およびDB標準溶液をHPLCに注入し, 得られたピーク面積より検量線を作成し, 定量を行った. HPLC条件は次のとおり. カラム: TSK GEL ODS 80TS (4.6 mm i.d.×150 mm), カラム温度: 40℃, 移動相: 水・アセトニトリル (3 : 7) 0.01 mol/L 1-ペンタンスルホン酸ナトリウム, 0.015 mol/L 硫酸ナトリウム含有, 流速: 1.0 mL/min. 注入量: 20 μ L. 検出器: UV検出器(206 nm).

結果及び考察

1. デナトニウムの紫外外部吸収スペクトル

デナトニウムの分子吸光係数を求めるにあたり, DBの紫外外部スペクトルは安息香酸のスペクトル, 224 nm (ϵ 9100), 268 nm (ϵ 547) と重なるため, デナトニウムを単離して測定した. すなわち 1,000 ppm DBメタノール溶液 1.0 mLを試料溶液の調製の項に従って処理し, 最終のデナトニウム 0.1% HCl-MeOH溶液を 10 mLとした. この溶液 (A): デナトニウム濃度 72.7 ppmとこれを 0.1% HCl-MeOH溶液で 8倍希釈した溶液 (B): デナトニウム濃度 9.09 ppmの紫外外部吸収スペクトルを測定し, Fig. 2に示した. それぞれのスペクトルピークの分子吸光係数 ϵ 値を求めた. その結果, 263 nm付近に特性吸収を見出したが ϵ 値が小さく, 定量分析にはより高感度の 206 nmを測定波長とした.

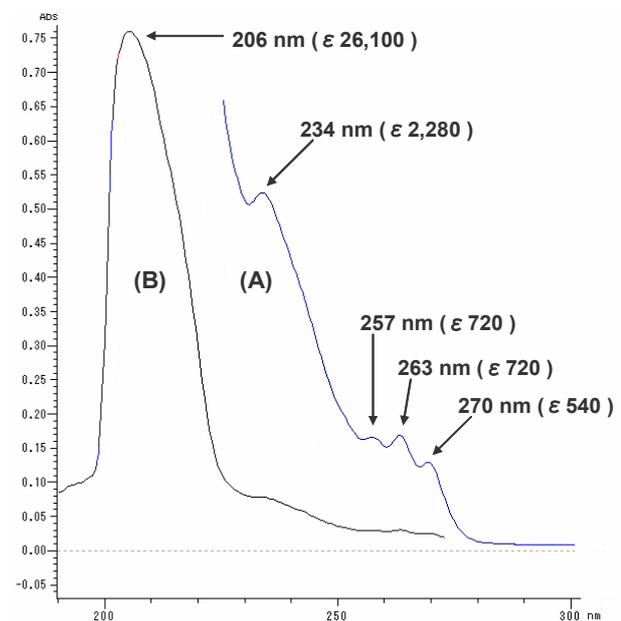


Fig. 2. UV Spectra of Denatonium

(A): 72.7 ppm, (B): 9.09 ppm 0.1% HCl-MeOH solution

2. カチオン交換カラム

DBの分析感度向上と妨害物質の影響を少なくするため, カチオン交換カラムを検討した. 簡便なディスポーザブルで使い勝手の良い容量 6 mLを用いた. 溶出液の塩酸濃度は妨害物質の溶出を抑える最低濃度の1%とし, 容量は定量的に回収できる 10 mLとした. 塩酸の希釈液は蒸発乾固し易いメタノールとした. その結果溶出液は 1% HCl-MeOH 10 mLとした. カチオン交換カラムはバリアン製MEGA BE-SCX 6MLの他にウォータース製Oasis MEX 6 ccも同様の結果を得た. 試料溶液の調製において, DBを本カラムに負荷し, メタノール洗浄した場合, 安息香酸アニオンはメタノール洗浄 20 mLで定量的に溶出することを確認した.

3. HPLC

HPLC測定にはカラムに汎用性のあるODSを用い, 1-ペンタンスルホン酸ナトリウムを用いるペアードイオンクロマ

トグラフイーとした。また硫酸ナトリウムを添加してクロマトグラムの安定化を図った。市販シャンプーにDBを 1 ppm添加して定量分析操作により得たスペクトルを Fig.3 に示した。保持時間 10 分に良好な形状のピークを得た。安息香酸アニオンは 2分の溶媒先端に溶出した。DBの検量線は 1.0~20 ppmで良好な直線性を得た。

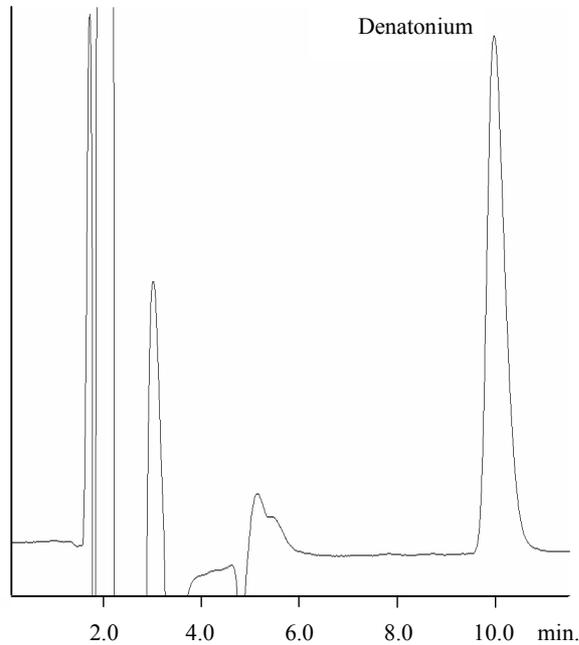


Fig. 3. HPLC Chromatogram of 1.0 µg/mL Spiked to a Commercial Shampoo

4. 添加回収実験

市販のシャンプー、ネイルエナメル及びスキンケアにDBを 1 ppm及び 1,000 ppmを添加して回収率を測定した。その結果はTable 2 に示したように、回収率94~123%, C.V.(%) 1.8~3.7 と良好な値を得た。

Table 2. Recovery of DB Spiked to Commercial Cosmetics

Sample	Spiked (ppm)	Detected* (ppm)	Recovery* (%)	C.V.* (%)
Shampoo	1.0	1.1	110	2.9
Shampoo	1,000	965	97	1.8
Neil enamel	1.0	1.18	118	3.7
Neil enamel	1,000	937	94	3.0
Skin cream	1.0	1.23	123	3.3
Skin cream	1,000	974	97	2.2

* : n=4

5. DB水溶液の味覚検査

DBの 0.25, 0.5, 1.0 ppm水溶液をそれぞれ 0.5, 1.0, 2.0 mLを口に含むことで、味覚による誤飲防止効果を検討し、その結果をTable 3に示した。成人が舌で瞬時に判定するには 0.5 mLの容量では不足であった。特に苦みは舌先より舌

根、舌側で高感度⁸⁾であり、舌上に溶液を回して判定するので、吐き出すのに時間を要し誤飲防止にならなかった。1 ppm, 1 mL以上では瞬時に耐え難い苦みを感じて吐き出し、誤飲防止効果が有ると認められた。

Table 3. Sensuous Bitter Taste for DB Aqueous Solutions *

Volume (mL)	DB Concentration		
	0.25 ppm	0.5 ppm	1.0 ppm
0.5	±	+	++
1.0	+	++	+++
2.0	+	++	+++

± : Weak bitter, + : Bitter, ++ : Strong bitter,

+++ : Intense bitter * : n = 4 adults

6. 市販DB配合表示製品中のDB分析

本分析法によりDB表示のある輸入製品中のDBを定量分析した。結果はTable 4に示すようにいずれの試料からもDBを 1.0~9,000 ppm検出した。試料1は容器等に 5%酢酸鉛の表示があり、別途著者が検査したところ表示相当量の鉛を検出した。薬事法は酢酸鉛の使用を禁止しており、本品は国内では販売不可である。試料 2 及び 3 は 2%サリチル酸の含有表示があり、分析値と一致した。薬事法では化粧品のサリチル酸添加上限を 0.2%としているため、当該製品を国内で販売するには医薬部外品または医薬品としての許可を必要とする。これら生理活性の強い成分が配合された製品を誤飲した場合のダメージは小さくないことから、誤飲防止の目的でDBが添加されたと考えられる。試料 4はDBそのものが有効成分である。試料 5 はミントフレーバーがあり、外見はお菓子そのものである。これらの市販製品の分析には妨害ピーク等は無く、良好に分析することができた。

Table 4. Determination of DB in Commercial

Cosmetics Indicating DB as An Ingredient		
Sample No. (country of origin)	DB Detected (ppm)	Content Note
1. Hair cream (Australia)	15.0	5% Lead acetate
2. Skin cleansing pad (England)	8.0	2% Salicylic acid
3. Acne cream (Canada)	1.0	2% Salicylic acid
4. Nail enamel (Swiss)	9,000	discourage nail biting
5. Soap (USA)	13.0	Sugar whip body scrub

7. インターネットに見るDB配合製品

インターネットにより海外製品のDB配合例を検討した。これらはいずれも人に対して誤飲防止を目的に添加

Table 5. Oversea Commercial Household Goods Indicating
DB Serched by Internet Browser

Sample	Country of Origin
1. Engine coolant and antifreeze	USA
2. Mosquito repellent lantern oil	USA
3. Heavy duty cleaner (hand aerosol)	USA
4. Hand sanitizer	USA
5. Snail and slug poison	USA
6. Deer repellent tree guard (hand aerosol)	USA
7. Nailenamel remover	USA
8. Detergent	USA
9. Shampoo (cranberry flavor)	England
10. Shampoo (mango & peach flavor)	England
11. Eau de toilette (vanilla flavor)	England
12. Cooling foot spray (peppermint flavor)	England
13. Rat poison	Italy
14. Finger paints	Germany

されたものと考えられる。Table 5 の 14 製品は国内では、2, 13は医薬部外品、4, 7, 9, 10, 11, 12は化粧品、1, 3, 5, 6, 8, 14 は家庭用品に属するものと考えられる。1は自動車用不凍液で、米国では法により30~50 ppmのDB添加を義務付けている⁹⁾。9, 10, 11, 12は食用フレーバー添加製品である。DBは人以外の動物、カラス、スズメ、犬、猫、兎、鹿、鼠にも摂食阻害効果を示し^{10, 11)}、6ではDBを森林保護目的の鹿忌避剤の主成分としている。11, 12はエタノール成分の多い製品であり、DB変性アルコールを用いることで誤飲防止剤としている。殺鼠剤13は鼠の好む餌に摂食阻害にならない濃度でDBを添加し、人に誤飲防止となるように作られている。14は幼児が手で描くペイントで、欧州玩具安全規格は100~300 ppmのDB添加を義務付けている¹²⁾。以上欧米では誤飲防止を目的にDBを添加している製品は多岐にわたる。化粧品に限った場合、石鹸、シャンプー等の洗剤、浴用剤、除光剤等洗い落とす化粧品、または頭髮、足用化粧品等に多く使用を認め、スキんクリーム、化粧水、ファンデーション等の顔や手に用い、洗い落とさない化粧品への使用は少ない。

8. DBの安全性

通産産業省公示¹³⁾によるとDBそのものの毒性は、「ラット(経口)LD₅₀: 584 mg/kg(メス), 640 mg/kg(オス), ラット(経皮)LD₅₀: >2.0 g/kg, 軽度の刺激性あり。」である。またDBが化粧品等に添加された場合のかぶれ、痒み等皮膚刺激が懸念されるが、DBを原因とする皮膚傷害報告は殺虫スプレー中のDBによるアレルギー性接触皮膚炎¹⁴⁾の報告がある。しかし他には報告は見られず、欧米での使用頻度を勘案すると安全性は比較的高いものと考えられた。

ま と め

化粧品中DBの分析法として陽イオン交換カラムによるクリーンアップを用い、HPLCカラムにODS, 移動相にペアーイオン法を用いて良好なクロマトグラムおよび感度を得た。

市販化粧品についてDBの添加回収実験をしたところ、1.0 ppm添加で、110~123%, 2.9~3.7 C.V. (%)、1,000 ppm添加で、94~97%, 1.8~3.0 C.V. (%) (n=4)の良好な結果を得た。

DB表示のある輸入化粧品5品目を検査したところ、1~9,000 ppmのDBを妨害無く良好に定量分析できた。

欧米では誤飲防止にDBを添加している製品は多岐にわたっており、誤飲防止は社会的常識となっている。一方国内には誤飲防止の発想は無いと思える。2005年5歳以下の幼児の経口事故数、23,888件¹⁾を考慮すると早急な欧米並みの対策が望まれる。特に食品フレーバーを添加した化粧品は幼児や老人にとっては食品そのものであり、誤飲対策は急務と考えられる。

文 献

- 1) <http://www.j-poison-ic.or.jp/homepage.nsf>
- 2) <http://www.bitrex.com/>
- 3) <http://www.ctechcorporation.com/>
- 4) http://www.cnerg.com/denatonium_saccharide.htm
- 5) Sugden, K., Mayne, T.G., Loscombe, C.R.: *Analyst*, **103**, 653-656, 1978.
- 6) Gadzata-Kopciuch, R., M., Buszewska, T., Buszewski, B.: *J. of Liq. Chrom. & Rel. Tech.*, **23**, 3133-3142, 2000.
- 7) Alvarez-Pineiro, M.E., Alda-Villaizan, M.J.L., Paseiro-Losada, P.: *J. of High Reso. Chrom.*, **20**, 321-324, 2005.
- 8) 山内昭雄, 鮎川武二: 感覚の地図帳, 60-61, 2001, 講談社, 東京.
- 9) http://www.house.gov/commerce_democrats/Press_109/109st96.shtml
- 10) <http://www.env.gov.bc.ca/epd/ipm/docs/envirowe/chap15.htm>
- 11) Clapperton, B.K.: *Science for Conservation* 263, A Review of The Current Knowledge of Rodent Behaviour in Relation to Control Devices, 25-26, 2006, Science & Technical Publishing, Wellington.
- 12) <http://www.kantonslabor-bs.ch/files/75/Report0602.pdf>
- 13) http://www.meti.go.jp/policy/alcohol/downloadfiles/tebiki_siyou.4.pdf, アルコール使用の手引き, 平成16年1月, 経済産業省.
- 14) Bjorkner, B.: *Contact Dermatitis*, **6**, 466, 1980.