

## 化粧品中の防腐剤一斉分析法の改良

立川 孟<sup>a</sup>, 橋本 秀樹<sup>a</sup>, 成瀬 敦子<sup>a</sup>, 中村 絢<sup>a</sup>, 蓑輪 佳子<sup>a</sup>,  
鈴木 仁<sup>a</sup>, 猪又 明子<sup>b</sup>, 守安 貴子<sup>b</sup>

当センターでは、薬事監視員が収去・試買等を行った化粧品について、化粧品基準に基づき試験検査を行っている。その中で、衛生試験法の防腐剤一斉分析法の対象成分である、パラオキシ安息香酸エステル類等13成分について、高速液体クロマトグラフィーによりスクリーニング検査を行っている。

従来法は、移動相にイオンペア試薬を用いていたため、そのまま質量検出器に導入することができなかった。そこで、試験法を改良し、質量検出器導入可能な移動相を用い、より短時間分析が可能な超高速液体クロマトグラフィーによる分析法を検討した。その結果、ギ酸系移動相で、フェニル-ヘキシルカラムを用いることにより、測定対象成分13種について良好な分離が可能な分析条件を確立した。

**キーワード**：化粧品，防腐剤，一斉分析，液体クロマトグラフィー，化粧品基準，質量検出器

## はじめに

化粧品における防腐剤は、化粧品基準<sup>1)</sup>によって配合の制限や最大配合量等が定められている。防腐剤はあらゆる化粧品に用いられており、製品表示のない防腐剤を検出する事例も多い。当センターでは、試買・収去等を行った化粧品を対象として、防腐剤のスクリーニング検査を行っている。分析対象成分は、表1に示した安息香酸、サリチル酸、ソルビン酸、デヒドロ酢酸、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸イソプロピル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸イソブチル、パラオキシ安息香酸ブチル、フェノキシエタノール、イソプロピルメチルフェノール、クロルフェネシンの全13成分である。

表1. 防腐剤13成分の略称

	名称	略称
別表第3の1 <sup>a)</sup>	安息香酸	BA
	サリチル酸	SA
	ソルビン酸	SO
	デヒドロ酢酸	DA
	パラオキシ安息香酸メチル	MP
	パラオキシ安息香酸エチル	EP
	パラオキシ安息香酸イソプロピル	iPP
	パラオキシ安息香酸プロピル	PP
	パラオキシ安息香酸イソブチル	iBP
	パラオキシ安息香酸ブチル	BP
	フェノキシエタノール	PE
	別表第3の2 <sup>b)</sup>	イソプロピルメチルフェノール
クロルフェネシン		CP

a) 化粧品基準<sup>1)</sup>の別表第3の1b) 化粧品基準<sup>1)</sup>の別表第3の2

防腐剤の分析法は、衛生試験法に記載されている一斉分析法<sup>2)</sup>の他にも、いくつかの分析法が報告されている<sup>3,4)</sup>。これまで当センターでは、従来法として衛生試験法に準じて検査を行ってきたが、使用する移動相の調製が複雑であり、超高速分析ではないため使用する溶媒量が多かった。また、イオンペア試薬を用いるため、そのまま質量検出器に導入することができなかった。化粧品の分析は不明ピークが多く、一斉分析法だけでは、検出・不検出を判断することが不可能な場合があり、その際には、条件を変更して追加試験を行う必要があった。質量検出器に導入することができれば、不明ピークについて判定できるとともに、分析時間の短縮が可能になると考えられる。そこで、質量検出器に導入可能な移動相を用いる試験法に改良し、その妥当性の確認を行った。

## 実験方法

## 1. 試薬

試験に使用したBA, EP, iPP, PP, iBP, PEは和光純薬工業(株)(現:富士フイルム和光純薬工業(株))製, SA, SO, DA, MP, BP, IPMPは東京化成工業(株)製, CPはAlfa Aesar製で、いずれも純度が98.0%以上である。また、メタノールは関東化学(株)製高速液体クロマトグラフィー用、テトラヒドロフラン(THF)及び1 mol/Lギ酸アンモニウム溶液は和光純薬工業(株)製液体クロマトグラフ用、ギ酸は和光純薬工業(株)製LC/MS用を用いた。

## 2. 試験溶液の調製

標準溶液の調製: 各防腐剤約250 mgを精密に量り、メ

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部医薬品研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

タノールで25 mLとし標準原液とした。標準原液を段階的に正確に取り、メタノールで希釈し直線性確認用標準溶液とした。濃度はそれぞれ1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250 µg/mLの8点とした。また、標準原液1 mLを正確に取り、メタノールで25 mLとし添加回収試験用標準溶液とした。

試料：添加回収試験では、いずれも測定対象成分を含まないことを確認したA：ボディクリーム、B：シャンプー、C：化粧水の3種類を用いた。従来法との比較では、各防腐剤を含むハンドクリーム、化粧水、シャンプー、ボディスクラブ、浴用料等を成分ごとに3検体ずつ（PEのみ10検体）用いた。

試料溶液の調製：添加回収試験及び従来法との比較における試料溶液の調製は次のとおり行った。試料0.2 gを10 mLメスフラスコに精密に量りとった。ここで、添加回収試験のみ添加回収試験用標準溶液0.5 mLを加えた。次に、THF2 mLを加え分散し、メタノール6 mLを加え10分間超音波処理を行った。さらに、メタノールで10 mLにメスアップし、0.2 µmのメンブランフィルターでろ過し、試料溶液とした。

### 3. 装置及び測定条件

#### 1) 従来法

LC：日本分光社製LC-2080Plus

LC条件：衛生試験法収載の一斉分析法に従った。

#### 2) 改良法

LC：アジレントテクノロジー社製1290 Infinity II

MS：アジレントテクノロジー社製6470

LC条件：カラム：ZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl

(2.1×100 mm, 1.8 µm, アジレントテクノロジー社製), 移動相：(A) ギ酸2.3 mL及び1 mol/Lギ酸アンモニウム7.2 mLを水で1 Lにしたもの、(B) メタノール, グラジエント条件：B液20% (0-4 min) →20-40% (4-8 min) →40% (8-16 min) →40-20% (16-16.01 min) →20% (16.01-20 min), 流速：0.6 mL/min, 測定波長：270 nm, 注入量：1 µL, カラム温度：50°C

MS条件：イオン化法：ESI, イオン化モード：ポジティ

表2. 各防腐剤 1~250 µg/mL における直線性

防腐剤	回帰式	相関係数
SA	$y=0.4952x+0.0351$	1.0000
BA	$y=0.4307x+0.4307$	0.9997
SO	$y=18.8681x-3.9245$	1.0000
PE	$y=0.9349x-0.2622$	0.9999
MP	$y=5.9435x-0.2869$	1.0000
DA	$y=1.0835x-0.3124$	1.0000
EP	$y=5.8247x+0.1697$	1.0000
CP	$y=0.4733x+0.0894$	1.0000
iPP	$y=5.3880x+0.0603$	1.0000
PP	$y=5.4454x-0.0246$	1.0000
IPMP	$y=0.8180x+0.2191$	1.0000
iBP	$y=5.1685x+0.2521$	1.0000
BP	$y=5.1438x-0.0381$	1.0000

ブ/ネガティブ, ドライングガス：N<sub>2</sub>, 280°C, 12 L/min, シースガス：N<sub>2</sub>, 400°C, 11 L/min, コリジョンガス：N<sub>2</sub>, ネブライザー：55 psi

### 結果及び考察

#### 1. LC条件の検討

##### 1) カラムの検討

カラムとして、数種類のODSカラムを用いて条件検討を行ったが、IPMP, BP, iBP相互の分離ができなかった。そこで、フェニルヘキシルカラムであるZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexyl, ACQUITY UPLC BEH Phenyl (日本ウォーターズ社製)を用いたところ、3成分が良好に分離された。両者の内、よりピーク形状や分離度の良いZORBAX Eclipse Plus Phenyl-Hexylを選択した。

##### 2) カラム温度の検討

イオンペア試薬を用いない移動相において、BAとSOの分離が不十分であった。カラム温度を検討したところ、これら2成分はカラム温度が高いほど分離度が大きくなる傾向が見られた。他の成分の分離状況も踏まえつつ、カラム温度は50°Cに設定した。

##### 3) 移動相の検討

使用する溶媒として、メタノールとアセトニトリルを検討し、保持時間5分までに溶出される成分の分離が良いメタノールを選択した。また、酸性化合物の保持のため、酸の添加を検討した。質量検出器への導入を目的としていたため、酢酸又はギ酸を用いることを検討したが、酢酸は低波長での吸収があったことから、より鮮明なUVスペクトルを得ることができたギ酸を選択した。また、ギ酸のみでは良好な分離や再現性・安定性確保が難しかったため、塩の添加を検討した。質量検出器への導入を考え、ギ酸アンモニウムを選択した。移動相のグラジエント条件及び酸と塩の添加量については、各成分の分離を見ながら調整し、実験方法3. 装置及び測定条件に記載した条件に決定した。

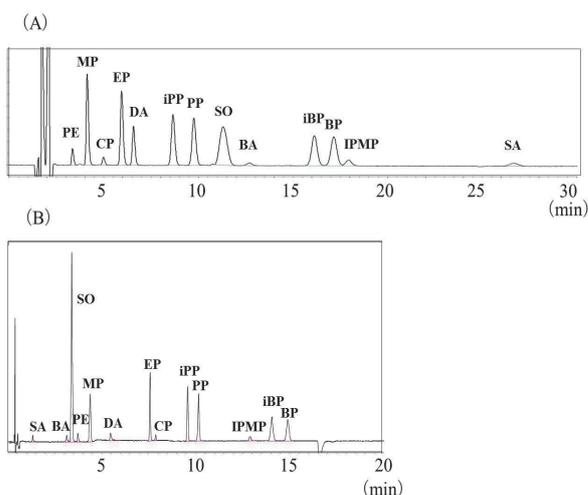


図1. 2 µg/mL標準溶液におけるUVクロマトグラム

(A) 従来法 (B) 改良法

4) 直線性の確認及びUVクロマトグラム

直線性確認用標準溶液について測定を行い、検量線の直線性を確認し、結果を表2に示した。相関係数が0.999以上となる原点付近を通る良好な直線性が得られた。また、報告下限濃度としている2 µg/mLにおける従来法及び改良法のUVクロマトグラムを図1に示した。従来法では分析時間が約30分であったのに対し、改良法では約20分と短縮された。改良法における最も分離の悪いBAとSOでも分離度2.0以上であり、完全に分離していることが確認された。

5) 再現性の確認

標準原液をメタノールで希釈し、50 µg/mLとした溶液を6回繰り返し測定し、防腐剤ごとのピーク面積の相対標準偏差 (RSD) を求め、結果を表3に示した。RSDは0.1~0.9%となり、すべての防腐剤で良好であった。

6) 添加回収試験

各防腐剤を前述の通り化粧品に添加・調製し、その回収率を求め、結果を表4に示した。回収率は92.7~103.7%とな

表3. 50 µg/mL標準溶液6回繰り返し注入におけるピーク面積のRSD

防腐剤	RSD (%)	防腐剤	RSD (%)
SA	0.5	CP	0.1
BA	0.6	iPP	0.3
SO	0.5	PP	0.3
PE	0.8	IPMP	0.6
MP	0.4	iBP	0.4
DA	0.9	BP	0.3
EP	0.2		

表4. 添加回収試験結果

防腐剤	回収率 (%)		
	検体 A (ボディークリーム)	検体 B (シャンプー)	検体 C (化粧水)
SA	96.3	99.0	99.8
BA	100.0	98.6	99.9
SO	93.4	93.1	92.7
PE	103.7	94.2	93.4
MP	98.2	97.6	98.0
DA	97.3	95.6	100.3
EP	97.7	96.6	97.4
CP	95.6	96.0	93.6
iPP	97.1	96.9	96.8
PP	99.1	97.3	97.5
IPMP	100.4	98.7	99.2
iBP	100.1	100.5	100.6
BP	98.0	96.7	97.4

表5. 従来法を100とした際の改良法の定量値

防腐剤	定量値	SD	防腐剤	定量値	SD
SA	100.0	2.4	EP	100.9	2.8
BA	98.5	4.2	CP	97.1	0.9
SO	101.1	2.4	PP	103.0	2.7
PE	98.2	2.8	iBP	103.5	3.1
MP	101.5	2.1	BP	100.3	0.6
DA	99.1	1.6			

N=3 (PEのみ10)

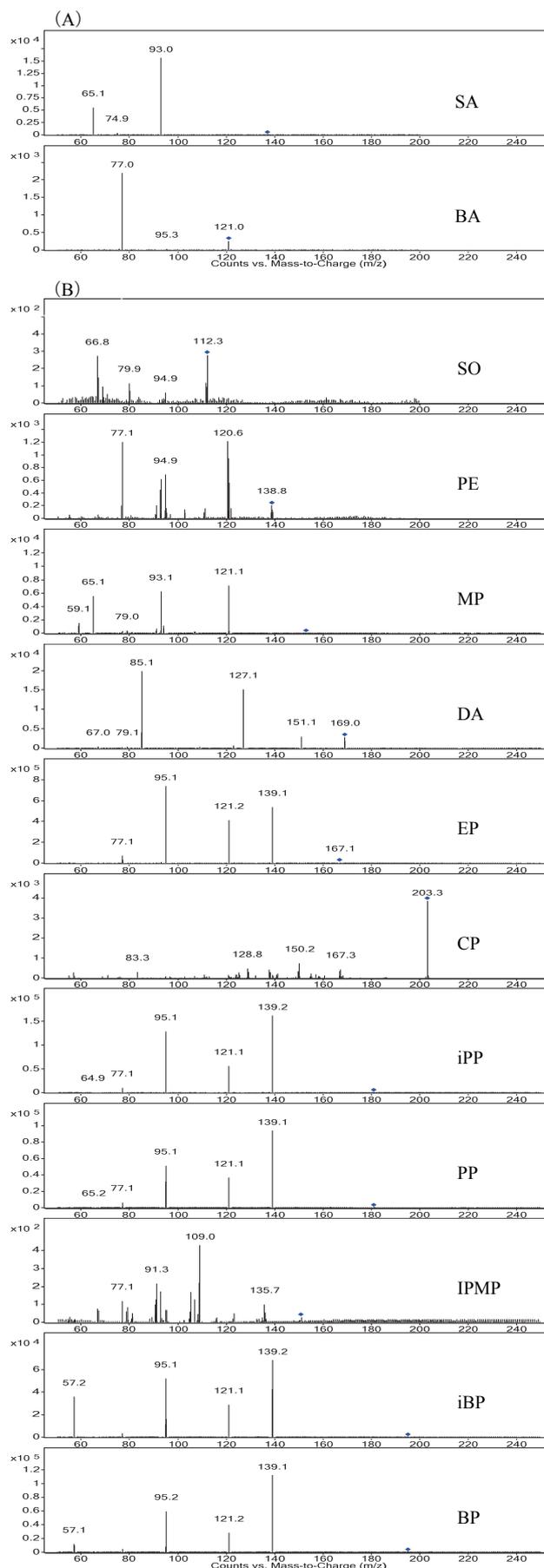


図2. プロダクトイオンスキャンにおけるMSスペクトル  
(A) ネガティブモード (B) ポジティブモード

り、すべての防腐剤で良好であった。

### 7) 従来法との比較

対象成分を含有する化粧品を用い、従来法との比較の結果を表5に示した。従来法での定量値を100としたところ、改良法での定量値は97.1~103.5となり、ほぼ従来法と同じ結果が得られた。また標準偏差 (SD) を求めたところ、0.6~4.2となった。

## 2. LC/MS/MS条件の検討

各防腐剤100 µg/mL溶液について[M+H]<sup>+</sup>もしくは[M-H]<sup>-</sup>をプリカーサーイオンとしてプロダクトイオンスキャンを行い、得られたMSスペクトルを図2に示した。SA及びBAはネガティブモードで、残りの防腐剤はポジティブモードで測定可能であった。強度の強いフラグメントをプロダクトイオンとして設定した。プロダクトイオンは2つずつ選択したが、BAではプロダクトイオンが1つしか得られなかった。続いて、MRMモードでフラグメンター電圧、ノズル電圧、キャピラリー電圧、コリジョンエネルギーを防腐剤ごとに調整した。防腐剤ごとのパラメーターを表6に示した。また、2 µg/mL標準溶液におけるMS (MRM) クロマトグラムを図3に示した。なお、PPとiPP、BPとiBPはプリカーサーイオンがそれぞれ同じ質量数であり、保持時間も近くどちらの条件でもピークが確認されるため、該当するピークを黒塗りで示した。

表6. LC/MS/MS条件パラメーター

防腐剤	検出器モード (+/-)	プリカーサーイオン (m/z)	プロダクトイオン (m/z)	フラグメンター電圧 (V)	ノズル電圧 (V)	キャピラリー電圧 (V)	コリジョンエネルギー (V)
SA	-	137	93 65	70	0	4000	20 32
BA	-	121	77 —	70	0	4000	8 —
SO	+	112	95 67	60	2000	6000	10 12
PE	+	139	121 77	75	2000	6000	4 24
MP	+	153	121 65	80	0	4000	12 36
DA	+	169	127 85	75	0	4000	10 18
EP	+	167	139 95	70	0	4000	8 16
CP	+	203	167 129	50	0	4000	6 14
iPP	+	181	139 95	55	0	4000	4 18
PP	+	181	139 95	55	0	4000	6 16
IPMP	+	151	109 91	60	0	4000	10 30
iBP	+	195	139 95	55	0	4000	4 20
BP	+	195	139	55	0	4000	4

## 3. 検体への適用

### 1) 多成分を含有する検体

製品の包装に、SA、MP、PE、EP、CP、PP、iBP、BPの計8成分の表示がある検体を本分析法で試験し、そのUVクロマトグラム及びMSクロマトグラムを図4に示した。化

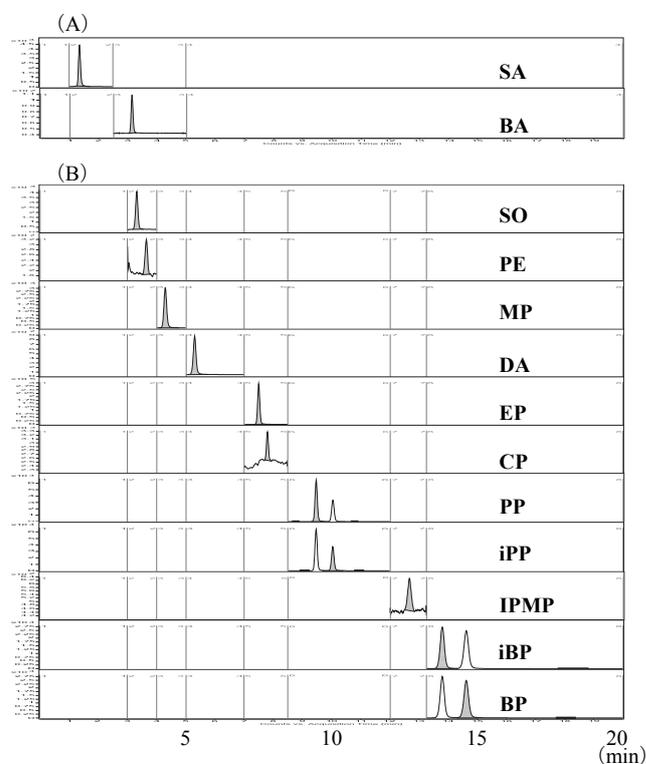


図3. 2 µg/mL標準溶液におけるMS (MRM) クロマトグラム  
(A) ネガティブモード (B) ポジティブモード

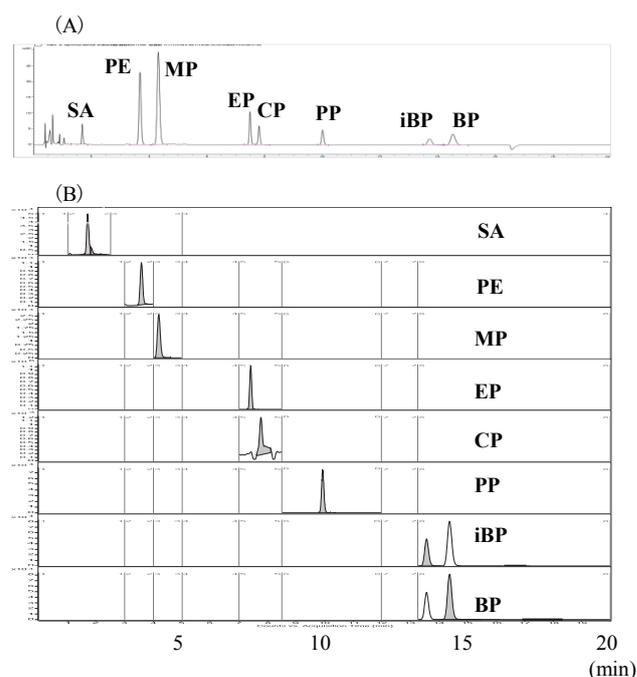


図4. 多成分を含有する検体における (A) UVクロマトグラム及び (B) MS (MRM) クロマトグラム

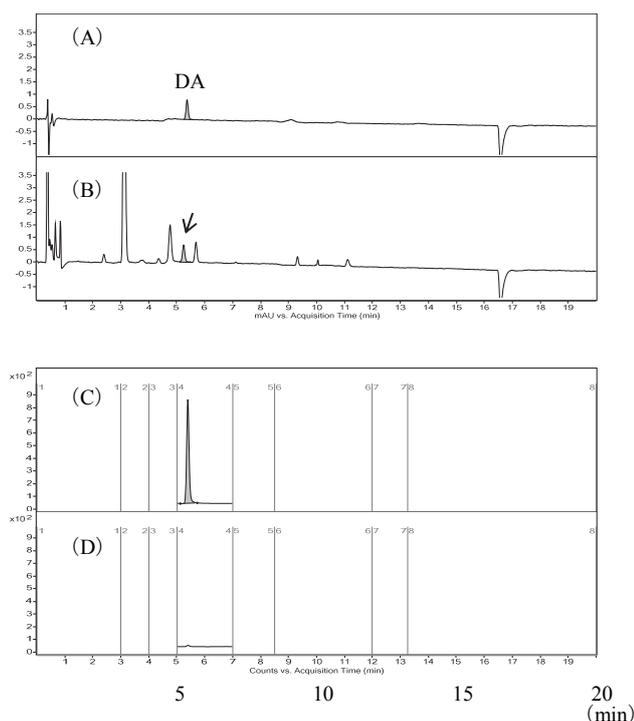


図5. 不明ピークのある検体におけるUV及びMSクロマトグラム

UVクロマトグラム：(A) 2 µg/mL標準溶液 (B) 試料溶液

MSクロマトグラム：(C) 2 µg/mL標準溶液 (D) 試料溶液

粧品は通常1～数種類の防腐剤が用いられている場合が多いが、本製品のように多成分を含有する検体においても、どちらのクロマトグラムでも良好に分離・確認することができた。

## 2) 不明ピークにより判定が困難な検体

化粧品には添加剤等が様々に使用されており、防腐剤の分析においても、測定対象成分の保持時間付近に、検体由来と考えられる不明ピークが現れることがある。その際に

は、検出・不検出を判断できず、追加試験を行わなければならない。図5では、試料溶液のUVクロマトグラムにおいて、DAの保持時間付近に報告下限濃度以上の面積を有するピークが確認された事例を示した。そこで、今回開発したMS条件で質量検出器に導入したところ、試料溶液においてピークは現れず、この検体のDAについては「検出せず」と判定することができた。従来であれば、分析条件を変更し追加試験を行う必要があったが、移動相やカラム等を変更することなく、質量検出器に導入することで、迅速な検査対応を図ることができた。

## ま と め

化粧品中の防腐剤一斉分析法の改良を検討し、ギ酸系移動相でフェニル-ヘキシルカラムを用いることにより、化学的性質が異なる化合物群から成る測定対象成分13種を超高速度液体クロマトグラフィーにより、良好に分離することができた。また、分析時間についても従来法の約2/3に短縮できた。さらに、直線性や再現性を確認し、今までの化粧品における一斉分析法に代えて使用できる方法であると考えられた。

その上、表示外成分の含有が疑われる場合には、移動相を変更することなく質量検出器に導入し確認できるように、13種すべての防腐剤において、MS条件を構築した。

## 文 献

- 1) 化粧品基準，平成12年9月29日，厚生省告示第331号，平成28年6月1日改正。
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2015，702-705，2015，金原出版，東京。
- 3) 森 謙一郎，中村義昭，大貫奈穂美，他：東京健安研七 年 報，**58**，103-106，2007。
- 4) 青山愛倫，田上貴臣，梶月由香，他：大阪府立公衛研所報，**53**，52-55，2015。

### An Improved Method for Simultaneous Analysis of Preservatives in Cosmetics

Hajime TACHIKAWA<sup>a</sup>, Hideki HASHIMOTO<sup>a</sup>, Atsuko NARUSE<sup>a</sup>, Aya NAKAMURA<sup>a</sup>, Keiko MINOWA<sup>a</sup>,  
Jin SUZUKI<sup>a</sup>, Akiko INOMATA<sup>a</sup>, and Takako MORIYASU<sup>a</sup>

We examined cosmetics which pharmaceutical inspectors collected or purchased at stores or firms in Tokyo, for the purpose of monitoring the quality of cosmetic product. These examinations were based on the *Standards for Cosmetics*.

We screened 13 preservatives, including *p*-oxybenzoic acid esters, in cosmetics by using a high-performance liquid chromatography method defined in *Methods of Analysis in Health Science*. However, the mobile phase of this method was not suitable for liquid chromatography/mass spectrometry analysis because it contained an ion-pair reagent. Therefore, we developed a new method for simultaneous analysis of their preservatives by ultra-HPLC-tandem mass spectrometry(UHPLC/MS/MS) by using a phenyl-hexyl column with a mobile phase containing formic acid. Our method made it possible to successfully separate the 13 preservatives in a shorter analytical time.

**Keywords:** cosmetics, preservatives, simultaneous analysis, HPLC, *Standards for Cosmetics*, mass detector

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan