

軟膏及びクリーム中に含有する防腐剤の定量法の構築

吹譯友秀、大澤沙千代、吉野宏毅¹⁾、篠塚達也、関根利一、西村真紀²⁾

Tomohide FUKIWAKE, Sachiyo OOSAWA, Hiroki YOSHINO, Tatsuya SHINOZUKA, Toshikazu SEKINE and Maki NISHIMURA

Development of a quantitative method of preservatives in ointment and cream products.

要旨

超高速液体クロマトグラフィーを用いて、軟膏及びクリーム中に含有する防腐剤の一斉定量分析法の構築を検討した。ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 カラムを用いることで、薄めたリン酸とアセトニトリルという調製が簡単な移動相で一斉分析が可能となった。構築した分析法で添加回収率、直線性、定量限界を求めたところ、良好な結果が得られた。また、市販された軟膏及びクリーム中の防腐剤を本分析法にて分析したところ、含有する防腐剤を検出できた。

キーワード：超高速液体クロマトグラフィー、防腐剤、軟膏、クリーム

Keywords: UHPLC-PDA、preservative、ointment、cream

(令和 6 年 6 月 21 日受付 令和 6 年 9 月 3 日受理)

はじめに

令和 2 年 3 月、千葉県健康福祉部薬務課(以下、薬務課)から軟膏(医薬品、医薬部外品及び化粧品に該当しない製品)中のサリチル酸の定量依頼があった。発端は東京都から過量のサリチル酸を含有している可能性のある旨の通報があり、千葉県内の業者から収去して検査依頼が行われたものであった。しかしながら、当研究室では軟膏中のサリチル酸の定量法を構築しておらず、定量結果を報告するまで、約 3 週間を要した。今後も軟膏中のサリチル酸の検査依頼がなされる可能性があること及びサリチル酸は化粧品においては防腐剤として使用されることもあることから、軟膏中の防腐剤の一斉定量分析法の構築を試みた。また、軟膏に形状が類似しているクリームも検討対象とした。

なお、検討の対象とした防腐剤成分は化粧品基準¹⁾中に配合制限があるソルビン酸(SOA)、安息香酸(BA)、サリチル酸(SA)及びパラオキシ安息香酸エステル(パラベン)類のうち、メチルパラベン(MP)、エチルパラベン(EP)、プロピルパラベン(PP)、イソプロピルパラベン(iPP)、ブチルパラベン(BP)及びイソブチルパラベン(iBP)6 成分の計 9 成分とした。

クリーム中のパラベン類の検査法や化粧品全般に適用できる防腐剤の一斉分析法は衛生試験法・注解²⁾に記載されているが、HPLC を用いた分析法であり、移動相の調製も複雑である。本研究では、迅速に分析可能となるよう超高速液体クロマトグラフィー(UHPLC-PDA)を用い、簡易な調製で済む移動相

での一斉定量分析法の構築を行った。

また、構築した分析法を用い、インターネット通販サイトで購入した軟膏及びクリーム並びに令和 2 年 3 月に薬務課から検査依頼のあった軟膏中の防腐剤の含有量の調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試薬及び標準品

1) 標準品：SOA(純度 98.0%以上)、BA(純度 99.5%以上)、SA(純度 99.5%以上)、MP(純度 99.0%以上)、EP(純度 99.0%以上)、PP(純度 95.0%以上)、iPP(純度 97%以上)、BP(純度 98.0%以上)及び iBP(純度 97%以上)は富士フイルム和光純薬から購入し使用した。

2) 試薬：アセトニトリルは Sigma Aldrich から HPLC 用を購入し使用した。その他の試薬は富士フイルム和光純薬から HPLC 用または特級を購入し使用した。0.20 µm polytetrafluoroethylene membrane filter (0.20 µm PTFE メンブランフィルター)はメルクミリポアから購入し使用した。

3) 標準溶液：各標準品を秤量後、メタノールで標準原液(1 mg/mL)を調製した。混合標準溶液は各標準原液 1mL を 10 mL メスフラスコに採取し、メタノールで 10 mL にメスアップし、各成分が 100 µg/mL となる溶液を調製。それをメタノールで希釈し検量線用の混合標準溶液を調製した。

4) 添加回収試験用標準溶液：各標準原液 1 mL を 10mL のメスフラスコに採取し、メタノールで 10mL にメスアップしたものを添加回収試験用標

1) 現：千葉県君津保健所、2) 現：千葉縣市原保健所

準溶液とした。

2. 試料

インターネット通販サイトで購入した軟膏2製品(軟膏1～2)及びクリーム7製品(クリーム1～7)を試料とした。また、令和2年3月に薬務課から検査依頼された軟膏1製品(軟膏3)も試料に加え、計10製品を試料とした。

3. 装置及び測定条件

1) 装置

デガッサー、ポンプ、オートサンプラー、カラムオーブン及びフォトダイオードアレイ検出器で構成される Waters 製 ACQUITY UPLC H-Class システムを使用した。

2) 測定条件

カラム：ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 (2.1 mm i.d. × 50 mm, 1.7 µm)、流速：0.5 mL/min、注入量：2 µL、カラム温度：40°C、移動相 A 液：0.1% リン酸溶液、B 液：アセトニトリル、グラジエント条件：0.0 分 (A : B = 80 : 20) → 1.0 分 (A : B = 70 : 30) → 8.0 分 (A : B = 55 : 45) → 8.2-10.0 分 (A : B = 10 : 90) → 10.2-12.0 分 (A : B = 80 : 20)、測定波長 (Max-plot)：210-400 nm、定量波長：229 nm (BA)、256 nm (MP、EP、PP、iPP、BP、iBP)、262 nm (SOA) 及び 303 nm (SA)。

4. 試料溶液の調製

試料約 0.1 g を精密に量り、メタノールを加えて 20 mL とした液を、10 分間超音波処理した。静置後、0.20 µm PTFE メンブランフィルターでろ過した液を試料溶液とした。軟膏3については、試料溶液をメタノールで 20 倍に希釈したものを分析した。

5. 添加回収試験

添加回収試験用試料として、軟膏1及びクリーム1を使用した。秤量した試料に、添加回収試験用標準溶液 1 mL を添加した以外の操作は試料溶液の調製と同様の操作を行った。試料調製は3回行った。クリーム1については、MP が含有していたことから、添加回収試験用標準溶液を添加せずに試料溶液の調製を行ったものも同時分析し、含有量の差から MP の回収率を算出した。

結果及び考察

1. UHPLC 条件の検討

当研究室において、無承認無許可医薬品取締事業で使用している UHPLC-PDA によるスクリーニング分析³⁾では ODS カラムを用いているが、その条件では iPP 及び PP の保持時間はそれぞれ 5.02 分と 5.09 分、iBP 及び BP の保持時間はそれぞれ 5.55 分と 5.59 分となっている。この条件では当該成分については、分離が困難であると考えられたことから、フェノール性化合物に対する選択性が ODS カラムと異なる

表1 添加回収試験結果

防腐剤	軟膏		クリーム	
	回収率 ^a (%)	RSD (%)	回収率 ^a (%)	RSD (%)
SOA	101.0	0.62	101.2	0.97
BA	100.8	0.65	101.2	0.88
SA	100.8	0.47	101.2	1.06
MP	100.5	0.63	101.3	1.91
EP	100.1	0.63	100.8	1.12
PP	100.5	0.62	101.1	0.92
iPP	100.5	0.63	100.7	0.75
BP	100.9	0.33	100.9	0.63
iBP	100.6	0.57	100.6	0.83

^a n=3

ACQUITY UPLC BEH Shield RP18 カラムを使用した。移動相については、沢辺ら⁴⁾の方法では薄めたリン酸とアセトニトリルを使用していることから、それらを使用した結果、9 成分について良好な分離が得られた(図1)。

2. 検量線の直線性、検出限界、定量限界

9 成分全て、0.1～100 µg/mL の範囲で良好な直線性 ($r^2=0.999$ 以上) が得られた。また、本分析法における検出限界は 9 成分全てで 0.03 µg/mL、定量限界は 9 成分全てで 0.10 µg/mL であった。

3. 添加回収試験

回収率と相対標準偏差 (RSD) を表1に示した。回収率は 100.1-101.3%、RSD は 2% 以下であり、全ての防腐剤で良好な結果が得られた。

4. 検体への適用

本分析法を用い分析した代表的な試料の UHPLC-PDA クロマトグラムを図2に、定量結果を表2に示した。6 製品から防腐剤を検出した。

化粧品基準における配合制限はパラオキシ安息香酸エステル及びそのナトリウム塩(パラベン類のこと)の合計として 1.0g/100g となっている。軟膏2は2種類のパラベン類が検出されているが、合計すると 0.10g/100g、クリーム5は3種類のパラベン類が検出されているが、合計すると 0.13g/100g となることから、化粧品基準を超える量は検出されなかった。軟膏3については、サリチル酸の過量含有の疑いがあり、薬務課が収去し検査依頼がなされたものであるが、分析の結果 25.76g/100g のサリチル酸が検出された。なお、令和2年3月に報告した数値は HPLC を用いたもので 26.7g/100g であり、約4年経過していること及び以前開封し検査した試料とは異なる容器(同商品名のもの)からサンプリングしたことから数値が若干異なつたと考えられた。化粧品基準における配合制限はサリチル酸塩類の合計として 1.0g/100g となっている。

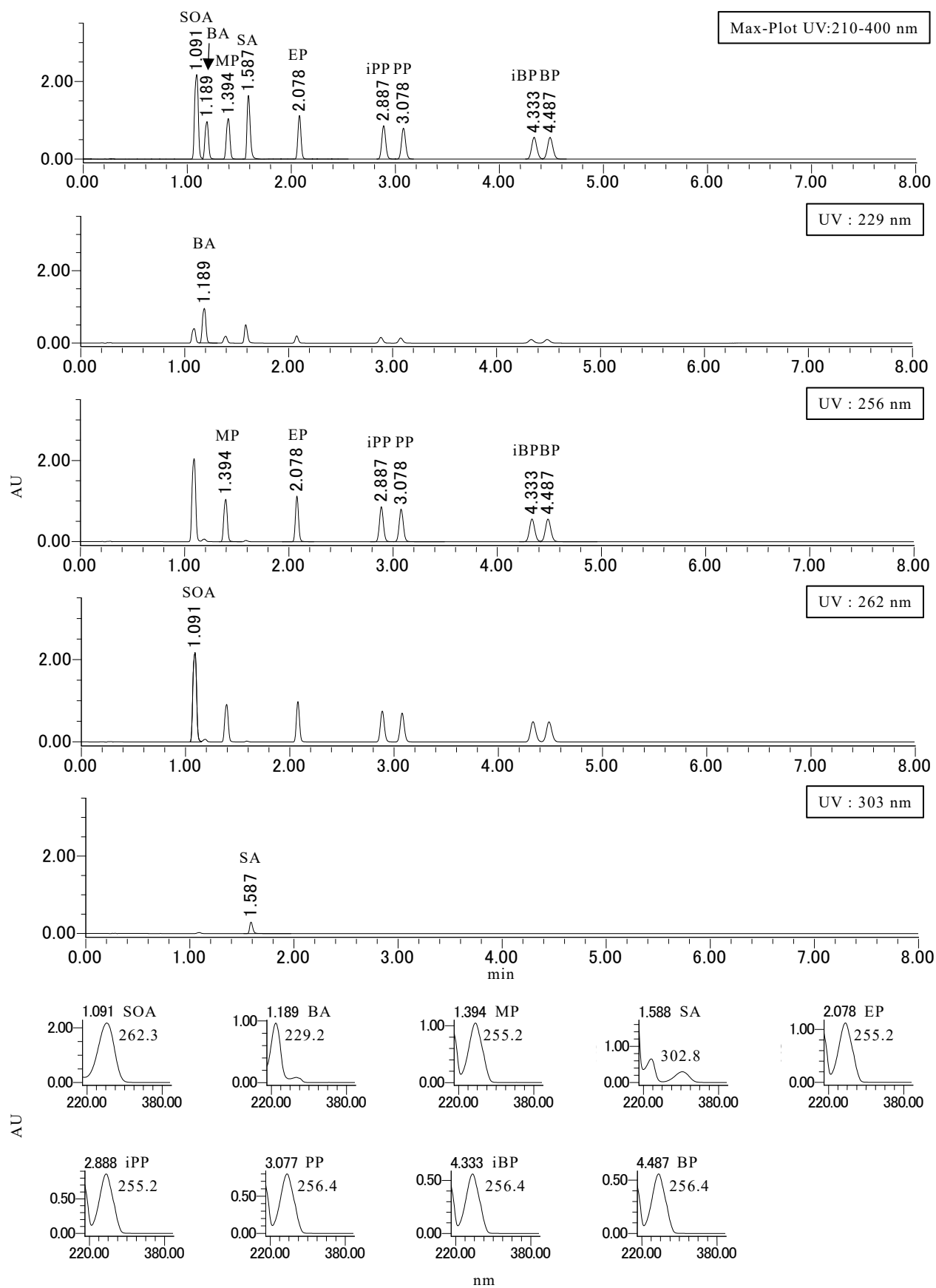


図1 混合標準溶液(100 µg/mL)のUHPLC-PDAクロマトグラム及び各成分のUVスペクトル

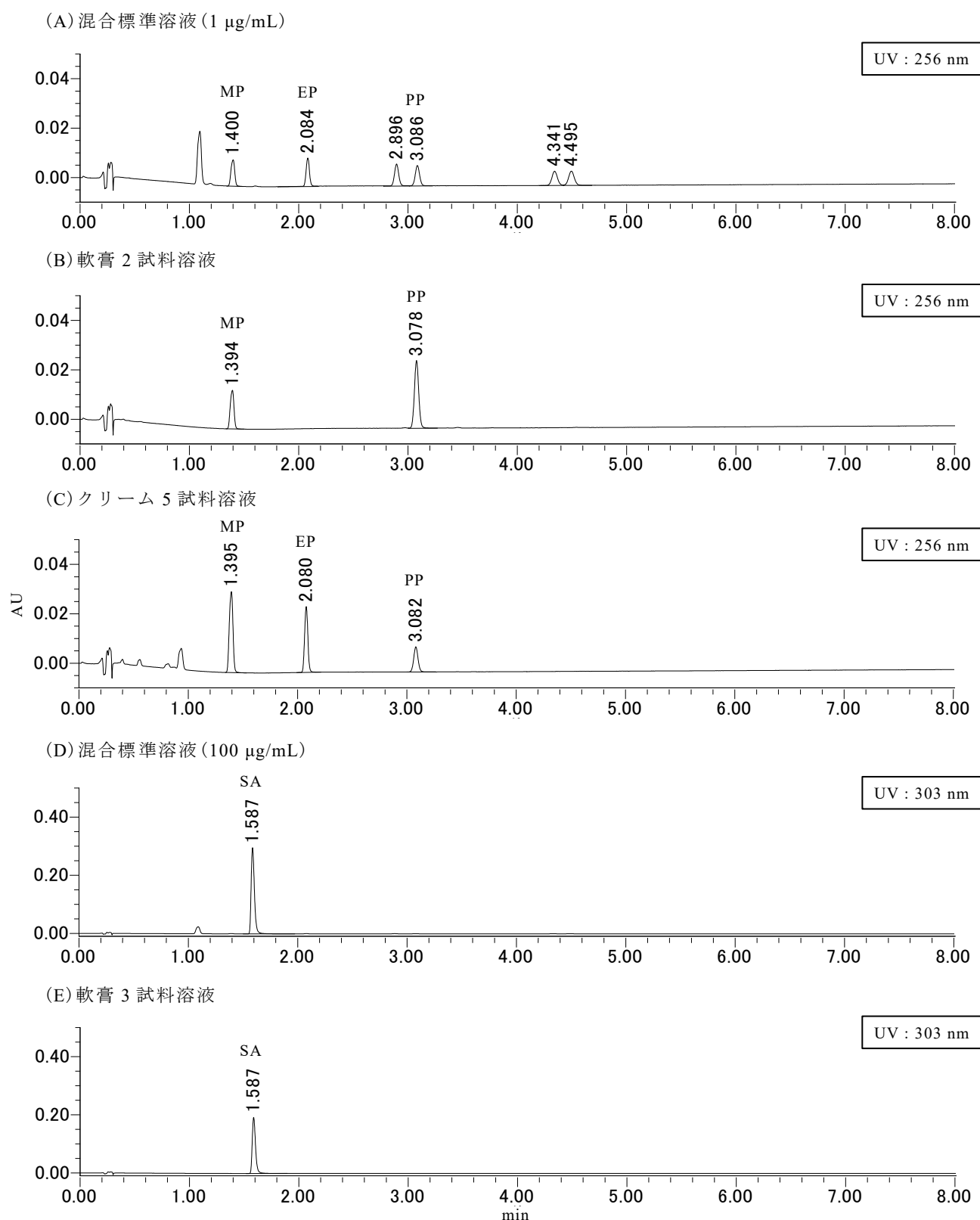


図2 代表的な検体の UHPLC-PDA クロマトグラム

(A) 混合標準溶液 (1 $\mu\text{g/mL}$)、(B) 軟膏 2 試料溶液、(C) クリーム 5 試料溶液、
(D) 混合標準溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$) 及び (E) 軟膏 3 試料溶液

表 2 防腐剤の定量結果

試料	検出成分	定量値 ^a (g/100 g)	RSD (%)
軟膏 1	不検出	—	—
軟膏 2	MP	0.03	0.56
	PP	0.07	1.19
軟膏 3	SA	25.76	1.18
クリーム 1	MP	0.20	0.24
クリーム 2	不検出	—	—
クリーム 3	不検出	—	—
クリーム 4	MP	0.10	1.38
クリーム 5	MP	0.06	0.40
	EP	0.05	0.49
	PP	0.02	0.49
クリーム 6	不検出	—	—
クリーム 7	MP	0.15	0.12

^a n=3

今回の含有量である 25.76g/100g はこれを 20 倍以上超過していた。また、サリチル酸を含有した軟膏は乾癬や白癬等の寄生性皮膚疾患の治療薬として使用されており、5%サリチル酸ワセリン軟膏や 10%のサリチル酸ワセリン軟膏が医薬品として販売⁵⁾されている。今回のサリチル酸の含有量はそれらの製品より 2 倍以上であることから、健康被害発生の可能性が否定できない。

参考として表 3 に外装等に表記された保存料と検出された成分を示した。軟膏 2 の外装には成分潤滑剤及びクリーム 4 の外装には湿潤剤、安定剤という記載が確認されたが、保存料に該当するような記載は確認できなかった。それにもかかわらず、軟膏 2 は MP 及び PP がクリーム 4 は MP が検出された。当該 2 製品は医薬品、医薬部外品及び化粧品に該当する製品ではないことから、製品の表示が正しくされていないと推測された。また、クリーム 2 の外装には MP の記載が確認されたが、MP は検出されなかった。

まとめ

軟膏及びクリーム中に含有する防腐剤について、UHPLC-PDA による一斉定量分析法の構築を検討した。添加回収試験において良好な結果が得られたことから、分析法として妥当であると考えた。また、本分析法を軟膏 3 製品及びクリーム 7 製品の計 10 製品に適用したところ、含有する防腐剤を定量することが出来た。過量に防腐剤が含有した製品が流通する可能性もあることから、今回構築した分析法を適用し、引き続き軟膏及びクリーム中の防腐剤の含

表 3 外装等に表記された保存料と検出された成分

試料	外装等に表記された 保存料	検出された成分
軟膏 1	なし	なし
軟膏 2	なし	MP, PP
軟膏 3	SA	SA
クリーム 1	MP	MP
クリーム 2	MP	なし
クリーム 3	なし	なし
クリーム 4	なし	MP
クリーム 5	MP, EP, PP	MP, EP, PP
クリーム 6	なし	なし
クリーム 7	MP	MP

有量調査を実施する必要がある。

文献

- 1) 厚生省告示第 331 号「化粧品基準」平成 12 年 9 月 29 日
- 2) 日本薬学会編：衛生試験法・注解 2020, 725-739 (2020), 金原出版
- 3) 吹譚友秀, 長谷川貴志, 芦澤英一, 小倉誠, 高橋市長, 西條雅明, 元木裕二: UPLC/PDA によるいわゆる健康食品中の医薬品成分スクリーニング分析法について, 千葉県衛生研究所年報, 59, 79-83 (2010)
- 4) 沢辺善之, 川口正美: HPLC を用いた化粧品中の防腐剤の定量法, 大阪府立公衆衛生研究所報, 47, 33-36 (2009)
- 5) 今日の治療薬 2024, 1119 (2024), 南江堂