〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
34 (1) 15-20 (1988)

連続液-液分配法/液-固抽出法による香粧品の前処理法の検討
界面活性剤含有試料中のパラオキシ安息香酸エステルの定量への応用¹⁾

中島慶子,^a 安田敏子,^a 大熊佐和子,^b 久保博昭,^b
木下俊夫,^b 中澤裕之,^c 藤田昌彦^c

千葉県衛生研究所,^a 北里大学薬学部,^b
国立公衆衛生院^c

Preparation of Sample Solutions from Cosmetics Using Continuous
Liquid-Liquid Partition/Liquid-Solid Extraction Method.
Application to the Determination of *p*-Hydroxybenzoate
Esters in Products Containing Surfactants

KEIKO NAKAJIMA,^a TOSHIKO YASUDA,^a SAWAKO OKUMA,^b HIROAKI KUBO,^b
TOSHIO KINOSHITA,^b HIROYUKI NAKAZAWA^c and MASAHICO FUJITA^c
Public Health Laboratory of Chiba Prefecture,^a 666-2, Nitona-cho, Chiba
280, Japan, School of Pharmaceutical Sciences, Kitasato University,^b
5-9-1, Shirokane, Minato-ku, Tokyo 108, Japan and Department
of Pharmaceutical Sciences, The Institute of Public Health,^c
4-6-1, Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo 108, Japan

(Received July 9, 1987)

An extraction and clean-up flow system using continuous liquid-liquid partition and a disposable octadecyl silane cartridge was devised for the determination of preservatives in cosmetics.

The system was applied to determine *p*-hydroxybenzoate esters (parabens) in cosmetics such as shampoos, hair rinses, creams, *etc.* containing surfactants which cause emulsification difficulties in the usual shaking extraction.

Parabens were extracted with a steady stream of droplets of diethyl ether from a sample in a glass tube and purified by passing through a Sep-Pak C₁₈ cartridge. High performance liquid chromatography was used for the determination. Parabens were separated on a Inertsil ODS column by using methanol-water (2:1, v/v) as a mobile phase and detected at 254 nm.

The present method was found to be simple and rapid with sufficient accuracy and precision. It was applicable to determine parabens in cosmetics containing surfactants.

Keywords—extraction; clean-up flow system; continuous liquid-liquid partition; HPLC; cosmetic; paraben; disposable octadecyl silane cartridge

緒 言

香粧品中の防腐剤であるパラオキシ安息香酸エステル (パラベン) の分析においては、試料の水溶液あるいは水性懸濁液を有機溶媒を用いて振とう抽出する前処理方法²⁾が一般的である。しかし、クリーム、乳液、シャンプー、ヘアリンス等界面活性剤を含有する香粧品 (以

下、界面活性剤含有香粧品と記す) にこの方法を応用した場合、しばしばエマルジョンの生成が起こり、円滑な抽出操作の妨げとなるばかりでなく、抽出効率を低下させる原因となる。

界面活性剤含有香粧品の前処理方法には、振とう抽出法の他に、加熱により試料中の水やアルコールを揮散さ

せた後、溶媒抽出する方法³⁾ 珪藻土等の担体に試料を混合分散させたものをクロマト管に充填し、溶媒を用いて溶出させる方法⁴⁾ 試料を凍結乾燥させた後、溶媒抽出する方法⁵⁾ 等がある。しかし、これらの方法はいずれも迅速分析法としては応用し難い面がある。

一方、生薬中の成分や生体試料中の薬物等の分離、抽出に、液-液分配法を利用した counter-current chromatography の一種である droplet counter-current chromatography (DCCC)⁶⁾ が盛んに応用されている。更に、DCCC の原理及び利点を生かした連続液-液分配法を用いて、食品中の残留飼料添加物^{7a,b)} や食品添加物^{7c)} を効率よく抽出、精製する方法が最近、報告されている。

そこで、今回、著者らはこれに市販のディスポーザブルミニカートリッジによる精製法を組み合わせた、オンラインの迅速な前処理法を考案し、界面活性剤含有化粧品に应用することを検討した。

実験方法

1. 試薬、試液及び試料 1) 試薬——パラオキシ安息香酸メチル(メチルパラベン)、パラオキシ安息香酸エチル(エチルパラベン)、パラオキシ安息香酸 *n*-プロピル(プロピルパラベン)、パラオキシ安息香酸 *n*-ブチル(ブチルパラベン)は東京化成、試薬特級を、エーテルはジエチルエーテル(和光純薬工業、試薬特級)を、その他の試薬は以下に特記したものを除き、すべて試薬特級を用いた。

2) 試作シャンプー——ラウリル硫酸トリエタノールアミン(花王エマール TD) 20 g, ラウリル硫酸ナトリウム(和光純薬工業、試薬一級) 10 g, トリエタノールアミン(化粧品原料基準適合品) 10 g, エチレンジアミン四酢酸二ナトリウム(EDTA) 1 g を水で 100 g としたもの。

3) 陰イオン界面活性剤溶液——試作 シャンプー 10 ml をエーテル飽和水で 100 ml としたもの。

4) 塩化ナトリウム溶液——30%塩化ナトリウム溶液をエーテルで飽和させたもの。

5) 試料——市販のシャンプー、ヘアーリンス、クリーム、ヘアトリートメント、浴用剤、ゼリー、ローション、歯みがき、液状石鹸等29製品。

2. 装置 1) 試料前処理装置——ポンプ：日本精密科学製高圧ポンプ NSP-800-9。脈動消去装置：ヤマトン製ダンパー。液滴生成管：内径 8 mm, 長さ 20 cm, 容量 10 ml のガラス管(東京理科器械製), 下端にはテフロンチューブがガラス管内に突出した形で固定され、上端はテフロンチューブの着脱が可能な構造を有する。ODS カートリッジ：Waters Associates, Sep-Pak C₁₈。

Fig. 1. Schematic Diagram of Apparatus for Extraction and Clean-up

A: reservoir, B: Teflon tube (0.5 mm i.d.),
C, D: glass tube (200×8 mm i.d.),
E: Sep-Pak C₁₈.

Fig. 1 に示すように、これらを内径 0.5 mm のテフロンチューブで接続し、試料前処理装置を試作した。

2) 高速液体クロマトグラフ (HPLC)——ポンプ：日本精密科学製高圧ポンプ NSP-800-9。脈動消去装置：日本精密科学製ダンパー NBD-3。試料注入装置：レオダイン製7125型。検出器：日本精密科学製波長可変 UV 検出器。データ処理装置：システムインスツルメンツ製 7000 B。

3. HPLC の条件 分析カラム：ガスクロ工業製 Inertsil ODS 5 (4.6 mm i.d.×150 mm)。カラム温度：室温。移動相：メタノール-水 (2:1, v/v)。流速：0.8 ml/min。測定波長：254 nm。検出感度：0.04 a.u.f.s。

4. 試料溶液の調製 試料 0.5 g をエーテル飽和水で 50 ml とする。クリームの場合は、試料をガラス棒で攪拌しながら、エーテル飽和水を徐々に加え、均一な希釈液とする。その 1.0 ml を Fig. 1 の液滴生成管 C の上端から管内に入れ、更に陰イオン界面活性剤溶液 0.5 ml, 塩化ナトリウム溶液 3.5 ml を加える。液滴生成管 D の上端からエーテル飽和水 6 ml を管内に入れる。C, D の上端にテフロンチューブを接続した後、容器 A 中の水飽和エーテルを流速 3 ml/min で送液する。(エーテルは C の水相中を霧状のエーテル液滴となって上昇し、水相上部に層積する。やがて、C の上端に達したエーテル溶液は D の下端を経て、D の水相中を再び液滴となって上昇する。D の水相上部に層積したエーテル溶液は続いて Sep-Pak C₁₈(E) へ送液される。) E の下端から流出したエーテル溶液 30 ml をとり、これを減圧下、溶媒留去し、残留物をメタノール 1 ml に溶解して試料溶液とする。送液後の液滴生成管 C, D 中の水相の体積が送液前に比べて減少することを防ぐために、あらかじめ予平

衡させた水及びエーテル相を用いる。なお、Eはあらかじめ水飽和エーテルで洗浄したものを用いる。

5. パラベンの定量 試料溶液 10 μ l を上記条件の HPLC に注入し、あらかじめ標準（メタノール溶液）のピーク高を用いて作成しておいた検量線から、試料中のメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンの含有量を求める。

結果及び考察

1. 抽出方法の検討

1) テフロンチューブ内径の検討 試作シャンプーにメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンをそれぞれ 0.1% (w/v) となるように溶解させた。この 10 ml をエーテル飽和水で 100 ml としたもの（以下、試作シャンプー希釈液と記す）2 ml を内径 10 mm（容量 15 ml）の液滴生成管 C に入れ、更に塩化ナトリウム溶液 8 ml を加えた。C の下端のテフロンチューブ内径を 0.5, 1.0, 2.0 mm と変え、水飽和エーテルを流速 3 ml/min で送液した。Sep-Pak C₁₈(E) の下端から流出したエーテル溶液を 30 ml ずつ 5 回分取し、各フラクション及び液滴生成管 C, D 内の残留液中のパラベン量を求めた。総パラベン量を 100% としたときの各フラクション中のパラベンの含有率を算出した。Fig. 2 にメチルパラベンについての結果を示した。

テフロンチューブ内径は 0.5 mm のとき、最も高い抽出率を示すことが認められた。他のパラベンについても同様の結果が得られた。このことから、以下の実験ではテフロンチューブの内径は 0.5 mm とした。

2) 液滴生成管内径の検討 内径 8 mm（容量 10 ml）、内径 10 mm（容量 15 ml）、内径 20 mm（容量 62 ml）の 3 種の液滴生成管 C に試作シャンプー希釈液 2 ml を入れ、更に塩化ナトリウム溶液をそれぞれ 3, 8, 55 ml ずつ加え、管内上部の空隙の容積がいずれも 5 ml となるようにした。なお、液滴生成管 D の内径はいずれの場合も 8 mm とした。1-1) と同様に各フラクション中のパラベンの含有率を求めた。Fig. 3 にメチルパラベンについて得られた結果を示した。

C の内径が小さい程、高い抽出効率を得られ、内径 8 mm ではメチルパラベンの抽出に必要な水飽和エーテルは 30 ml であった。他のパラベンについても同様の結果が得られた。このことから、以下の実験では C の内径は 8 mm とすることとした。

3) 流速の検討 液滴生成管 C（容量 10 ml）に試作シャンプー希釈液 2 ml と塩化ナトリウム溶液 3 ml を入れた。水飽和エーテルの流速を 1, 3, 5 ml/min と

Fig. 2. Recovery of Methyl Paraben from the Teflon Tubes (B in Fig. 1) of Various Inner Diameters

—○—: 0.5 mm, —△—: 1.0 mm, —□—: 2.0 mm.

Fig. 3. Recovery of Methyl Paraben from the Glass Tubes (C in Fig. 1) of Various Inner Diameters

—○—: 8 mm, —△—: 10 mm, —□—: 20 mm.

変え、Sep-Pak C₁₈(E) の下端から流出したエーテル溶液を 10 ml ずつ 3 回分取し、1-1) と同様に各フラクション中のパラベンの含有率を求めた。いずれの流速においてもパラベンの抽出に要する水飽和エーテルは 30 ml であり、流速は抽出効率には影響しないことが認められた。しかし、流速 5 ml/min では C の界面（上層である有機相と下層である水相の境界面）が初めの位置から大きく上昇し、水相が上端から流出するおそれがあった。そこで、以下の実験では、水飽和エーテルの流速は 3 ml/min とした。

4) 陰イオン界面活性剤の抽出効率への影響 市販シャンプー 0.5 g をエーテル飽和水で 50 ml とし、その 1 ml と塩化ナトリウム溶液 4 ml を液滴生成管 C に入れた。これに水飽和エーテルを送液したところ、上層であるエーテル溶液中にエマルジョン様の液滴が生成し、澄明なエーテル溶液が得られなかった。この現象は他の市販シャンプーやヘアリンスにも同様に起こり、また試料の希釈倍率を変えても防ぐことができなかった。ところが、試作シャンプーを用いた検討においては、このようなエマルジョン様の液滴は全く生成しなかった。このことから、試作シャンプー中の陰イオン界面活性剤がエマルジョン様の液滴の生成を抑える作用を有することが考えられる。そこで、(1) 2% ラウリル硫酸トリエタノールアミン、(2) 1% ラウリル硫酸ナトリウム、(3) ラウリル硫酸トリエタノールアミンとラウリル硫酸ナトリウムの混合溶液（それぞれ、2%、1% となるように混合した）の 3 種の陰イオン界面活性剤溶液（いずれもエーテル飽和水溶液）を調製した。パラベンを含有しない市販シャンプーにメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンをそれぞれ 0.1% 添加し、その 1.0 g をエーテル飽和水で 100 ml とした（以下、市販シャンプー希釈液と記す）。その 1.0 ml と、塩化ナトリウム溶液 3.5 ml を液滴生成管 C に入れ、更に、上記 3 種の陰イオン界面活性剤溶液 0.5 ml を加え、水飽和エーテルを送液した。Sep-Pak C₁₈(E) の下端から流出したエーテル溶液 30 ml をとり、パラベンの含有率を求めた。いずれの陰イオン界面活性剤溶液を用いた場合も、エーテル溶液中にエマルジョン様の液滴は生成せず、澄明なエーテル溶液が得られた。ラウリル硫酸トリエタノールアミン、ラウリル硫酸ナトリウムは、それぞれ単独では十分な抽出効率を得られなかったが、混合溶液では良好な抽出効率を得られた (Table I)。これは、混合溶液を使用したことにより、エーテルがより微細な液滴となったこと、また、陰イオン界面活性剤の存在下でパラベンが界面活性剤と複合体を作り、エーテルへの分配率あるいは溶解速度が大きくなったことが原因として考えられる。

ところで、液滴生成管 C に加えた陰イオン界面活性剤は、パラベンと同様、エーテル液滴中に分配されるため、その添加量はできる限り少ないことが望ましい。そこで、先に用いたラウリル硫酸トリエタノールアミンとラウリル硫酸ナトリウムの混合溶液の最少有効添加量を調べた。Table II に示すとおり、最少有効添加量は 0.5 ml であった。

0.20, 0.25 ml では水相と有機相が混合し、界面が形

TABLE I. Recovery of Parabens from Shampoo Mixed with Different Surfactants

Surfactant	Recovery (%)			
	Methyl paraben	Ethyl paraben	Propyl paraben	Butyl paraben
TL ^{a)}	69.5	65.0	61.6	61.1
SL ^{b)}	87.9	87.1	87.3	86.5
TL+SL	100.0	100.0	100.0	100.0

a) Triethanolamine laurylsulfate (2%).

b) Sodium laurylsulfate (1%).

Parabens were extracted with droplets of diethyl ether (30 ml) from aqueous dilution of shampoo (1 ml) mixed with solutions of different surfactants (0.5 ml) and 30% sodium chloride (3.5 ml).

TABLE II. Recovery of Parabens from Shampoo Mixed with Various Volumes of the Solution of Surfactants

Solution of surfactants ^{a)} (ml)	Recovery (%)			
	Methyl paraben	Ethyl paraben	Propyl paraben	Butyl paraben
0.10	84.3	74.5	61.8	49.4
0.15	79.4	68.7	57.8	50.4
0.20	- ^{b)}	-	-	-
0.25	-	-	-	-
0.50	100.0	100.0	100.0	100.0
1.00	100.0	100.0	100.0	100.0
2.00	100.0	100.0	100.0	100.0

a) Solution of 2% of triethanolamine laurylsulfate and 1% of sodium laurylsulfate.

b) Emulsification.

Parabens were extracted with droplets of diethyl ether (30 ml) from aqueous dilution of shampoo (1 ml) mixed with 30% sodium chloride and various volumes of the solution of surfactants.

成されなかった。なお、エーテル液滴中に分配した陰イオン界面活性剤は、液滴生成管 D の水相中に約 60% 捕捉されることが、分析⁸⁾の結果、明らかとなった。D は本来、C から水相が流出したときの安全のために用いたものであるが、同時に C から送液されたエーテル溶液を洗浄する作用を有していることになる。

また、上記ラウリル硫酸トリエタノールアミンとラウリル硫酸ナトリウムの混合溶液 0.5 ml と共に、硫酸で pH を 2.0 に調整した塩化ナトリウム溶液 3.5 ml を用い、同様にエーテル溶液 30 ml 中のパラベンの含有率を求めた。その結果、メチルパラベン 52.0%、エチルパラベン 33.3%、プロピルパラベン 22.8%、ブチルパラベン 17.5% といずれも抽出効率が大きく低下した。振とう抽出法と異なり、液滴を用いる抽出法では pH の低下に伴って液滴が大きくなったため、抽出効率が低下したもの

Fig. 4. High Performance Liquid Chromatograms Obtained from Tooth Paste

- (A): obtained by "Standard Method of Analysis for Hygienic Chemists" including clean-up with acetonitrile-hexane partition.
 (B): obtained by the present method (without Sep-Pak C₁₈).
 (C): obtained by the present method (with Sep-Pak C₁₈).
 BP: butyl paraben.

と考えられる。Cの水相中にトリエタノールアミンを0.1%添加したところ、試料によらず抽出時のpHが約8となり、また、パラベンの抽出効率も良好であることが認められた。なお、pH 10.5以下であれば、パラベンは水相中に残留することはない。⁹⁾

2. 精製方法の検討

1) **Sep-Pak C₁₈による精製** ゼリー状の歯みがきを衛生試験法²⁾記載のヘキサン-アセトニトリル分配法に従って前処理を行い、HPLCで分析したところ、Fig. 4(A)のようにパラベン以外のピークが認められた。この歯みがきに本法を応用して前処理を行ったところ、これらのピークを除去することができた(C)。また、Sep-Pak C₁₈を接続せずに本法で前処理を行った場合は(B)のようであり、Sep-Pak C₁₈による精製効果が認められた。

本法において、Sep-Pak C₁₈はエーテル溶液中に溶解している不純物の吸着と共に、エーテル溶液中の浮遊物を除去するフィルター的作用を併せ持っている。そのため、Sep-Pak C₁₈を用いた方が、用いない場合よりもより澄明な試料溶液となることが認められた。

2) **EDTAによる精製** シャンプー中にはしばしばフケ防止剤としてジंकピリチオンが配合されている。これらのシャンプーを本法(EDTAを含まない陰イオン界面活性剤溶液を使用)を用いて分析したところ、ジंकピリチオンがクロマトグラム上の妨害となった(Fig. 5(A))。液滴生成管Cの水相中にEDTAを

Fig. 5. Effect of Addition of EDTA on Removal of Zinc Pyrithione (ZPT)

MP: methyl paraben.

BP: retention time of butyl paraben.

High performance liquid chromatograms were obtained from anti-dandruff shampoo by the present method with (B) and without (A) EDTA.

TABLE III. Recovery of Parabens Added to Shampoo

	Recovery (%) ^{a)}
Methyl paraben	93.4±3.3
Ethyl paraben	97.3±1.6
Propyl paraben	100.9±0.6
Butyl paraben	100.4±1.3

^{a)} Results of 5 replicates (mean±R.S.D.).

Shampoo containing 0.1% of each paraben was used.

0.01%添加したところ、ジंकピリチオンのピークの消滅が認められた(B)。このことは、振とうによる二層分配の際のジंकピリチオンの挙動¹⁰⁾と一致している。

3. 添加回収実験

パラベンを含有しない市販のシャンプーにメチルパラベン、エチルパラベン、プロピルパラベン、ブチルパラベンをそれぞれ0.1%添加し、本法を応用したときの回収率をTable IIIに示した。

いずれのパラベンにおいても90%以上の回収率が得られ、再現性も良好であった。

4. 市販化粧品品の分析結果

市販の化粧品29試料のうち、液状石鹸である1試料では液滴生成管Cの中で水相と有機相が混合し、界面が形成されなかったため、本法を応用することができなかった。本法を応用することができた28試料のうち、パラベンを含有しない試料は8試料であった。パラベンを含有

TABLE IV. Analytical Results of Parabens in Commercial Cosmetics

Sample	Paraben (%)			
	Methyl paraben	Ethyl paraben	Propyl paraben	Butyl paraben
Shampoo I	0.01	- ^a	-	-
II	0.03	0.01	-	-
III	0.03	-	-	-
IV	0.09	-	0.13	0.09
V	0.18	-	-	-
VI	0.10	-	0.09	-
Hair rinse I	0.05	-	-	-
II	0.10	-	-	-
III	0.10	-	-	-
IV	0.09	-	-	-
V	0.11	-	-	-
VI	0.05	-	-	-
Cream I	0.22	-	0.11	-
II	-	0.05	-	0.08
Jelly lotion I	0.14	-	0.03	-
II	0.14	-	-	-
Hair mousse	0.05	-	0.05	-
Hair color	0.30	-	-	-
Hair treatment	0.03	-	0.03	-
Tooth paste	-	-	-	0.18

^a) Not detected.

していた20試料の分析結果を Table IV に示した。

28試料の分析の結果と表示指定成分¹¹⁾ としての表示

の有無に不一致が見られたものが5試料認められた。パラベンが検出された20試料のうち、11試料についてメーカーから製造記録書を入手することができた。検出されたパラベンが製造記録書に記載されている配合量の120%を越えたものが4試料認められた。パラベンは他の化粧品原料中にあらかじめ防腐剤として配合されている場合も多い。化粧品の製造に際しては、これらキャリアオーバー成分としてのパラベンに対しても十分な配慮がなされるべきであろう。

ま と め

液滴を利用した連続液-液分配法と市販のディスポーザブルミニカートリッジを用いる試料調製法について検討した。本試料調製法を用いて、界面活性剤含有化粧品からパラベンを抽出、精製し、HPLCで分析した。本法の特長及び利点は以下のとおりであった。

1. 振とうを行わないため、エマルジョンが生成しない。
2. オンライン方式であるため、実験者の有機溶媒に対する暴露が少ない。
3. 振とう抽出法に比べて、抽出に必要な有機溶媒が少なく、かつ迅速である。
4. 省力化できる。なお、大容量のポンプを用いて、本試料前処理装置を並列に接続し、一度に多試料の前処理を行うことも可能と考えられるので、今後検討を行いたい。

引用文献及び注

- 1) 本論文の要旨の一部は日本薬学会(京都, 1987年4月)で発表。
- 2) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解, 追補,” 金原出版, 東京, 1983, pp.1335—1337.
- 3) “化粧品の分析・試験法と機能効果の測定法,” フレグランスジャーナル臨時増刊5巻, フレグランスジャーナル社, 東京, 1984, pp.24—31.
- 4) 三上栄一, 野田直希, 山田貞二, 早川順子, 宇野圭一, 衛生化学, **32**, 34 (1986); 鎌田国広, 舘 照雄, 原田裕文, 衛生化学, **30**, 144 (1984).
- 5) 四方田千佳子, 中村恵三, 伊藤善志男, 粧技誌, **20**, 5 (1986).
- 6) T. Tanimura, J.J. Pisano, Y. Ito, R.L. Bowman, *Science*, **169**, 54 (1970).
- 7) a) 中澤裕之, 四宮一総, 藤田昌彦, 北田善三, 山本政利, 永田知子, 込山茂久, 高島英伍, 食衛誌, **26**, 7 (1985); b) T. Nagata, M. Saeki, H. Nakazawa, M. Fujita, E. Takabatake, *J. Chromatogr.*, **281**, 367 (1983); c) Y. Kitada, Y. Ueda, M. Yamamoto, K. Shinomiya, H. Nakazawa, *J. Liq. Chromatogr.*, **8**, 47 (1985).
- 8) 日本薬学会編, “衛生試験法・注解,” 金原出版, 東京, 1980, pp.774—775.
- 9) 中島慶子, 安田敏子, 千葉衛研報告, **4**, 1 (1980).
- 10) A.J. Senzel (ed.), “Newburger’s Manual of Cosmetic Analysis, 2nd ed” The Association of Official Analytical Chemists, Inc., Washington, D.C., 1977, p.116.
- 11) 昭和55年9月26日厚生省告示第167号。