前処理法に重層カラムクロマトグラフィーを用いた
乳液、クリーム類中のグリチルリチン酸の定量

三上栄一, 山田貞二, 早川順子, 山田益生
愛知県衛生研究所

Determination of Glycyrrhizin in Cosmetic Lotions and Creams with
Clean-up Procedure on Bi-layer Column Chromatography

EIICHI MIKAMI, SADAJI YAMADA, JUNKO HAYAKAWA
and MASUO YAMADA

Aichi Prefectural Institute of Public Health, Nagare 7-6,
Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya 462, Japan

(Received February 19, 1988)

A method was described for quantitative analysis of glycyrrhizin in cosmetic lotions and creams.

Glycyrrhizin was separated from the cosmetic base and other ingredients by bi-layer (upper; celite, lower; silica gel) column chromatography with methanol containing 0.5% acetic acid. The eluate was washed with *n*-hexane. The methanol layer was concentrated *in vacuo* and determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) on Develosil ODS using a mobile phase of acetonitrile-1% acetic acid (35:65). Methyl salicylate was employed as an internal standard.

Recoveries of glycyrrhizin obtained from model cosmetics were more than 96% and coefficients of variation were less than 2.2%.

This method with clean-up procedure on bi-layer column chromatography was much suitable for the determination of glycyrrhizin in cosmetic lotions and creams.

Keywords—HPLC; glycyrrhizin; cosmetic; glycyrrhizin determination; bi-layer column chromatography

緒 言

甘草の主成分であるグリチルリチン酸は、化学的に安定であり、溶解性、乳化性がすぐれていること、また緩和ながら副腎皮質ホルモン様の作用¹⁾や抗炎症作用²⁾も認められることなどから乳液、クリーム類、歯みがき等に従来から広く使用されている。³⁾

化粧品に添加されるグリチルリチン酸は、種別許可基準によって配合量を規定することが検討されており、⁴⁾これに伴って精度の高い分析方法の確立が必要となっている。

グリチルリチン酸の分析方法として、ガスクロマトグラフィー法⁵⁾及び HPLC 法⁶⁾などが報告されている。しかしこれらの大部分は食品、医薬品を対象としたもの

で、種々の油脂や界面活性剤を含む化粧品についての報告はほとんどみられない。

そこで著者らは、乳液、クリーム類中のグリチルリチン酸の HPLC による分離定量法を確立するために、その前処理としてセライト-シリカゲルの重層カラムクロマトグラフィーを応用した方法について検討したところ、良好な結果が得られたので報告する。

実 験 方 法

1. 試薬 グリチルリチン酸標準溶液——定量用グリチルリチン酸 (和光純薬社製) 10 mg を精秤し、70% エタノールに溶かして 100 ml とした。この標準溶液を必要に応じて70%エタノールで希釈して用いた。

内標準溶液——サリチル酸メチル (和光純薬社製) 1

ml を、エタノールに溶かして 2000 ml とした。

カラム用シリカゲル——シリカゲル60 (70—230 メッシュ, メルク社製) を、105 °C 2 時間活性化したものを用いた。

カラム用セライト——セライト No. 545 (Johns-Manville 製)。

その他の試薬——すべて試薬特級 (和光純薬社製) を用いた。

2. 器具及び装置 クロマト管——内径 13 mm, 長さ 25 cm の活栓付ガラス製クロマト管。

高速液体クロマトグラフ——ポンプ: 島津 LC-6 A, 試料注入装置: レオダイン社製7125型, 紫外分光光度計検出器: 島津 SPD-6 A, データ処理装置: 島津クロマトパック C-R 3 A。

3. 試験溶液の調製 セライト 3 g 中に試料約 0.7 g を精秤し, よく混和して乳鉢中で分散させた後, あらかじめカラム用シリカゲル 2 g を酢酸エチルを用いて充てんしたカラムに, 積層させる。乳鉢は少量の酢酸エチルで洗う。調製した重層カラムにまず酢酸エチルを流し, 溶出液 30 ml を除く。ついでメタノール-酢酸 (100:0.5) 溶液を流し, 溶出液 40 ml を分取する。溶出速度は 1 分間に約 1 ml とする。この溶出液を減圧下 45 °C で約 10 ml となるまで濃縮する。この濃縮液を分液ロートにとり, ヘキサン 30 ml で洗浄し, メタノール層を分取する。つづいてメタノール層を減圧下 45 °C で約 2 ml となるまで濃縮後, 内標準溶液 1.0 ml を加え, 70 % エタノールで正確に 5 ml として, HPLC 試験溶液とする。

4. HPLC による定性・定量 試験溶液及びグリチルリチン酸標準溶液のそれぞれ 20 μ l を注入し, 下記の HPLC 条件により分析する。両者から得られた保持時間及びピーク面積により定性・定量を行う。

HPLC の測定条件——カラム: Develosil ODS (5 μ m) 4.6 mm i.d. $\times$ 15 cm (野村化学製), 移動相: アセトニトリル-1 % 酢酸 (35:65), 流速: 0.8 ml/min, 温度: 室温, 測定波長: 254 nm, 検出感度: 0.04 a.u.f.s.

結果及び考察

1. 試料溶液調製方法の検討

著者ら⁷⁾は, 化粧品とくに乳液, クリーム類に含まれるパラオキシ安息香酸エステル類の分析に際して, 重層カラムクロマトグラフィーを用いた前処理法について報告した。重層カラムは, 油脂類の除去を目的とした前処理によく用いられるセライトに試料を混和して, よく分散させた後, あらかじめ充てんされたシリカゲル上に, できるだけ密に積層して調製した。この方法は, 試

TABLE I. Chromatographic Behavior of Some Antioxidants and Antimicrobial Compounds

Compound	Retention time (min)
Glycyrrhizin	9.68
Methyl salicylate (I.S.)	20.82
Propyl gallate	4.30
Sorbic acid	4.83
Benzoic acid	4.94
Salicylic acid	5.61
Dehydroacetic acid	7.21
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	2.75
Resorcin	2.80
Methyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	5.58
Ethyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	8.86
Propyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	15.53
Butyl <i>p</i> -hydroxybenzoate	28.95
Isopropyl methylphenol	29.32
Trichlorocarbanilide	—
Oxybenzone	—
Butylated hydroxyanisole	—
Butylated hydroxytoluene	—

—: More than 30.00 min.

Operating conditions——column: Develosil ODS (4.6 mm i.d. $\times$ 15 cm), mobile phase: acetonitrile-1 % acetic acid (35:65), flow rate: 0.8 ml/min, temperature: ambient, detection: 254 nm, sensitivity: 0.04 a.u.f.s.

料をカラムに導入することが容易で, 分析の際の妨害物質, 共存成分の除去に有用であった。そこで今回も乳液, クリーム類中のグリチルリチン酸を分析するために, 前処理操作として重層カラムクロマトグラフィーの応用について検討した。

まず HPLC によってグリチルリチン酸を分析する際の移動相溶媒として, アセトニトリル-1 % 酢酸 (35:65) を用いた。この測定条件で, グリチルリチン酸及び内標準物質として用いたサリチル酸メチルの保持時間は, それぞれ 9.68 分, 20.82 分であり, 両者は完全に分離した。また一般的に化粧品中に配合される可能性のある酸化防止剤, 防腐殺菌剤等の成分について, HPLC を行った結果を Table I に示した。その結果, グリチルリチン酸と保存剤として使用頻度の高いパラオキシ安息香酸エチルとの分離が不十分であることが認められた。

そこで各種溶媒を用いて, まず重層カラムからのグリチルリチン酸の溶出挙動について検討を行い, その結果を Table II に示した。グリチルリチン酸は, ヘキサン, クロロホルム, 酢酸エチル, アセトン各 40 ml では全く溶出されず, アセトニトリル, メタノール各 40 ml では十分な溶出が認められなかった。しかしながらメタノ

TABLE II. Relation between Recovery of Added Glycyrrhizin and Various Elution Solvents on a Bi-layer Column

Solvent	Recovery (%)
Hexane	0
Chloroform	0
Ethyl acetate	0
Acetone	0
Acetonitrile	12
Methanol	78
Methanol-acetic acid (100 : 0.5)	100
Methanol-acetic acid (100 : 1)	100
Methanol-acetic acid (100 : 2)	100

Added glycyrrhizin was 200 μ g.

TABLE III. Recoveries of Glycyrrhizin Added to Commercial Cosmetics

Sample	Weight (g)	Added (μ g)	Recovery (%)	C.V. (%)
Milk lotion	0.7	60	97.8	1.9
	0.7	300	96.8	1.5
Cream	0.7	60	97.5	2.0
	0.7	300	97.3	2.2
Tooth paste	0.7	60	96.1	2.0
	0.7	300	97.9	1.7

C.V.: Coefficient of variation.

ールに酢酸を添加したもの 40 ml で溶出した場合には、高い回収率が得られた。メタノール 100 ml に添加する酢酸量を 0.5—2.0 ml の範囲でその溶出を検討したところ、酢酸濃度によって回収率の差は認められず、そのため溶出溶媒としてはメタノール-酢酸 (100 : 0.5) とした。更に HPLC のクロマトグラム上で保持時間がグリチルリチン酸と近似していたパラオキシ安息香酸エチルは、酢酸エチル 30 ml で、ほぼ完全に流去させることができた。これらの結果から重層カラム調製後のカラム洗浄には、酢酸エチル 30 ml を用いて行い、グリチルリチン酸の溶出は、メタノール-酢酸 (100 : 0.5) 40 ml で行うこととした。

つぎに得られた溶出溶媒を減圧下約 10 ml に濃縮した後、ヘキサン 30 ml を用いて洗浄した。グリチルリチン酸のヘキサン層への移行は認められなかった。

またグリチルリチン酸標準溶液を希釈して 10—100 μ g/ml の標準系列を作り、各 20 μ l を前記の HPLC 測定条件に従って操作し、検量線を作成したところ、原点を通る直線関係が成り立つことが認められた。

TABLE IV. Analytical Results of Glycyrrhizin in Commercial Cosmetics

Sample	Content ($\times 0.001$ %)
Milk lotion	6.5
Milk lotion	7.0
Milk lotion	38.8
Cream	6.6
Cream	14.1
Cream	40.1
Tooth paste	13.5
Tooth paste	13.9

Fig. 1. Liquid Chromatograms of Commercial Cosmetics

A: Cream, B: tooth paste.

1: glycyrrhizin, 2: methyl salicylate (I.S.).

2. 市販化粧品における添加回収実験及び分析結果

本法を実際試料に適用した場合の精度を確認する目的で、グリチルリチン酸を含有しない乳液、クリーム等の各 0.7 g に、グリチルリチン酸をそれぞれ 60 μ g, 300 μ g 添加し、求めた回収率を Table III にまとめた。その結果、いずれの場合も 4 回の平均回収率は 96% 以上であった。またそれぞれの回収率における変動係数も 1.5—2.2 % とほぼ満足できる結果が得られた。

本法により市販の乳液、クリーム、歯みがき中のグリチルリチン酸を分析した結果を Table IV に示した。またクリーム、歯みがき分析の際のクロマトグラムを Fig. 1 に示した。

ま と め

化粧品、医薬部外品中のグリチルリチン酸を定量するため、前処理法に重層カラムクロマトグラフィーを応用

した。その結果、分析の際の妨害物質、共存成分がほとんど除去でき、しかも回収率は96%以上と極めて良好であった。簡易なカラム処理を組み込んだ本定量法は、種々の市販化粧品とくに乳液、クリーム類中のグリチルリチン酸の分析には有用な方法と考えられる。

引用文献

- 1) a) 矢野三郎, 日本内分泌, **34**, 745 (1958); b) A. Kumagai, K. Nishino, A. Shimomura, T. Kin, Y. Yamamura, *Endocrinol. Jpn.*, **14**, 34 (1967).
- 2) a) R.S.H. Finney, G.F. Somers, *J. Pharm. Pharmacol.*, **10**, 613 (1958); b) K.K. Tangri, P.K. Seth, S.S. Parmar, K.P. Bhargava, *Biochem. Pharmacol.*, **14**, 1277 (1965).
- 3) 日本化粧品技術者会編, “化粧品科学ガイドブック,” 薬事日報社, 東京, 1979.
- 4) a) 厚生省薬務局審査第二課監修, “化粧品種別許可基準,” 薬事日報社, 東京, 1986; b) 厚生省薬務局審査第二課監修, “化粧品種別許可基準Ⅱ,” 薬事日報社, 東京, 1987.
- 5) 吉田豊造, 寺門正夫, 小野田光正, 金子 力, 昭和49年度厚生科学研究報告, 1975, p.186.
- 6) a) 北田善三, 玉瀬喜久雄, 佐々木美智子, 西川喜孝, 食衛誌, **21**, 354 (1980); b) 加藤三郎, 衛生化学, **26**, 318 (1980); c) 小川俊太郎, 吉田昭義, 三谷洋子, 薬誌, **96**, 122 (1976); d) K. Sagara, Y. Ito, T. Oshima, M. Kawaura, T. Misaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 5364 (1985).
- 7) 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).