N-ニトロソジエタノールアミンの
分析に関する検討 (2)

荒金久美 佐藤信夫

Investigation for analysis of N-nitrosodiethanolamine (2)

Kumi Arakane, Nobuo Sato

Three analytical methods of N-nitrosodiethanolamine(NDELA) in cosmetics were investigated by common detectors, instead of the Thermal Energy Analyzer (TEA).

The first method employed silica gel column as preliminary clean up of the sample, and NDELA was determined as acetyl derivative by gas chromatography (GC) using an electron capture detector (ECD).

The second method employed ion-exchange chromatography for the separation of NDELA from cosmetic products and NDELA was determined by high performance liquid chromatography (HPLC) and UV detector (UV).

The third, SEP-PAK Cartridge clean up method, employed a Waters SEP-PAK C₁₈ Cartridge which removed most of the interferences. Determination of NDELA was the same as the 2th method.

These methods showed good recoveries and quantitative results at 300 and 500 ppb level, and could be widely applicable to many types of cosmetics products as conventional and rapid methods for the determination of NDELA.

1. 緒 言

N-ニトロソ化合物の一種である N-ニトロソジエタノールアミン (NDELA) が発ガン作用を示すことは、既に知られている。1977年、アメリカにおいて Fine らにより、化粧品中に NDELA が検出されることが報告されて以来、その対応のために、数々の分析法が開発、検討されている。

NDELA の分析には現在のところ、ニトロソ化合物を特異的に検出する熱エネルギー検出器 (TEA) を検出器としたガスクロマトグラフィー (TEA-GC)¹⁻³⁾ または高速液体クロマトグラフィー (TEA-HPLC)⁴⁾ が最も信頼性が高いと評価されているが、TEA はかなり高価であり、また用途も限られている点で必ずしも一般的な方法とは言えない。従って TEA 以外の検出器による、汎用のクロマトグラフィー (GC, HPLC 等) を用いた迅速かつ選択性の高いスクリーニング法の確立が強く望まれるところである。

従来、TEA を用いない NDELA の分析法としては比色法^{5,6)}、HPLC^{7,8)}、GC⁹⁾ などが行なわれ、検出器も UV⁸⁾、電子捕獲検出器^{1,9)} (ECD)、MS 等多くの報告例がある。しかし、それぞれ一長一短があり、まだ検討の余地を残しているのが現状である。

著者らは、それらの分析法の中からいくつかを選び、その化粧品への応用について検討した結果、NDELA の回収率には、化粧品の形態と分析操作の前処理法の影響が大きいうちの結果を得、詳細を前報¹⁰⁾にて報告した。

今回、著者らは更に肌に残留する時間が長く、分析操作上、化粧品におけるすべての形態に適応可能である等の理由から試料としてクリームを選び、乳化時に NDELA 標準液を一定量正確に添加したものを試料として、前処理法を中心に検討を行なった。すなわち、第一法としてシリカゲルカラムで精製したのち GC-ECD にて定量する方法、第二法として二種類のイオン交換樹脂を通したのち、UV-HPLC で定量する方法、更に第三法として、

株式会社小林コーセー研究所：東京都北区栄町 48-18
Research Laboratory, Kobayashi Kose Co.Ltd. :
48-18 Sakae-cho, Kita-ku, Tokyo

微量物質の迅速な分離に最近よく利用されているセップバックカートリッジ(ウォーターズ社製)¹¹⁾を前処理に使用し、UV-HPLC で定量する方法を試みた。その結果、いずれの方法もスクリーニング法としてはほぼ満足のいく結果が得られ、また本法はシャンプーにも応用可能であることが判明したので報告する。また、日本化粧品工業連合会 NDELA 分析専門委員会(以下、専門委員会と言う)においても同試料の分析を行なったので、その結果もあわせて報告する。

2. 実験

2.1 試料

種々の化粧品の中でも、化粧水、シャンプー等と比較して、クリームのような乳化系の試料からの NDELA の抽出は困難と言える。そこで今回は、あらかじめ濃度既知の NDELA 標準液を添加したクリームを試料として選び、より信頼性の高い前処理法、分析法の検討及び分析値の比較を試みた。ここで用いたクリームは、Table-1 のようなトリエタノールアミンを含むごく一般的な処方のクリームで、乳化後、温度が 60°C まで下がったところで 500ppb 相当量の NDELA 標準液を添加し、よく攪拌して完全に均一としたものである。これを用いて分析値の比較を行なった。

Table-1 Formula of model cream containing 500 ppb NDELA

Stearic acid	5.0%
Stearyl alcohol	4.0
Glyceryl monostearate, lipophilic	2.0
Sorbitan sesquioleate	2.0
Polyoxyethylene sorbitan trioleate (20 E. O.)	1.0
Spermaceti	3.0
Hydrogenated oil	5.0
Lanolin	2.0
Liquid petrolatum	12.0
Methyl parahydroxybenzoate	0.1
Triethanolamine	1.0
Propylene glycol	5.0
Water, q. s.	100.0
NDELA	500 ppb

なお、NDELA 標準液は東京化成製 NDELA を精製したものをエタノールで希釈して用いた。また、同クリームで、NDELA を添加していないものをブランクの試料として添加回収実験に使用した。

2.2 前処理法及び分析法

前述のように NDELA の回収率には主にその前処理法が大きく影響を及ぼすと考えられる。従って、今回は以下の三種の前処理法の検討を行なった。

1. シリカゲルクロマト法
2. イオン交換樹脂法
3. セップバック C₁₈ 法

2.2.1 シリカゲルクロマト法

竹内ら¹²⁾の方法に準じて行なったが、いったんシリカゲルカラムに NDELA を吸着させて妨害成分を除去したのち、シリカゲルカラムから NDELA を溶出させる際の溶出溶媒の種類と量は、試料に応じて変化させる必要がある。NDELA 標準液のみで回収実験を行なったところ、酢酸エチル 100 ml で溶出させれば約 95% の回収率が得られたので、試料についても同様の方法で行なった。定量は ECD-GC にて行なった。操作の概略と ECD-GC 条件はそれぞれ Fig.-1, Table-2 に示す。

2.2.2 イオン交換樹脂法

福田ら¹³⁾の方法に従い、最終残渣を蒸留水 1 ml に溶かして試験溶液とし、UV-HPLC で定量した。操作の概略を Fig.-2, UV-HPLC 条件を Table-3 に示す。

2.2.3 セップバック C₁₈ 法

試料約 6 g を精秤し、スルファミン酸アンモニウム 0.25 g 及びアセトニトリル 30 ml を加えて 10 分間攪拌したのち、無水硫酸ナトリウム 10 g を加えて更に 5 分間攪拌し、濾過する。残渣をアセトニトリル 10 ml で 2 回洗浄

Fig.-1 Silica gel chromatographic separation of NDELA

Table-2 ECD-GC conditions for NDELA determination

Column	: (a)Silicone OV-275 (2%), 3mm ID×2m (b)Silicone OV-17 (1.5%) Silicone DC QF-1 (1.95%)	3mm ID×1m
Column temp.	: (a)175°, (b)160°	
Injector temp.	: 280°	
Detector	: ECD ⁶³ Ni 10 mCi	
Carrier gas	: N ₂ 50ml/min	
Sample size	: 2 μl	

Fig.-2 Ion-exchange chromatographic separation of NDELA**Table-3** UV-HPLC conditions for NDELA determination

Column	: Radial Pak C ₁₈ , Waters Associates, 7.9mm ID×10cm (reverse phase packing)
Mobile phase	: H ₂ O
Flow rate	: 2 ml/min
Detector	: UV 254nm, 0.005 aufs.
Sample size	: 25—100 μl

し、汙液と洗液をあわせて分液ロートに移し、n-ヘキサン 100ml で3回振とうして油分を除去する。アセトニトリル層を分取し 50°C で溶媒を留去する。その際、濃縮時の発泡をおさえるために必要に応じて酢酸エチル 10ml ずつを加えた。残渣を蒸留水 10ml に溶かし、あらかじめメタノール 2ml, 蒸留水 5ml を流して活性化しておいたセップパック C₁₈ のカートリッジに通す。残渣を蒸留水 5ml で3回洗浄し、洗液も同様にセップパック C₁₈ に通して精製したのち、流出液をすべて捕集して水で正確に 25ml とする。これを試験溶液として UV-HPLC にて定量した。操作の概略を **Fig.-3** に示す。UV-HPLC 条件は **Table-3** と同様である。

3. 結果及び考察

3.1 前処理法の検討

3.1.1 シリカゲルクロマト法

NDELA 標準液を添加していないブランクのモデル処

Fig.-3 Separation of NDELA by SEP-PAK C₁₈ cartridge

Fig.-4 ECD-GC chromatograms of spiked model cream with 300ppb NDELA
 (a) Silicone OV-275 (2%)
 (b) Silicone OV-17 + Silicone DC QF-1 (1.5% + 1.95%)

方のクリームに分析時に 300ppb の NDELA を加えて、シリカゲルカラムにて前処理した時の ECD-GC クロマトグラムを Fig.-4 に示す。

カラムは二種類用い、ダブルチェックを行なった結果、それぞれ保持時間(a)約18分、(b)約5分30秒の位置に NDELA のピークが認められた。今回のモデル処方クリームにおいては、溶出溶媒として酢酸エチル 100ml を用いれば、NDELA の添加回収率が 85~95% となり良好であるが、やはり試料によっては溶出溶媒の種類と量を適宜選択することが望ましいと思われる。GC 装置が安定するまでかなりの時間を要するという欠点はあるが、検出限界は 10ppb 程度であり、かなり低濃度の NDELA までこの方法により検出可能である。

3.1.2 イオン交換樹脂法

ブランクのモデル処方クリームに NDELA を 500ppb 分析時に添加したものを試料として前処理を行ない、得られた UV-HPLC クロマトグラムを Fig.-5 に示す。

(a)はブランクのクリームのクロマトグラムで、矢印の位置が NDELA 溶出位置となるが、妨害成分は見あたらない。本法における添加回収率はほぼ 100% であり、検出限界は 50ppb であった。感度の点では前述の ECD-GC に劣るが、操作が複雑でなく不揮発性の NDELA をわざわざアセチル誘導体にする必要がないこと、また検出器の安定に要する時間が短かく、適応できる化粧品品の範囲も広いことなどから、有効なスクリーニング法であると思われる。

Fig.-5 UV-HPLC chromatograms of (a) nonspiked model cream and (b) spiked model cream with 500 ppb NDELA, Column : Radial Pak C_{18} 7.9 mm ID $\times$ 10cm, Mobile phase : H_2O , Flow rate : 2 ml/min, Sample size : 25 μ l

3.1.3 セツプバック C_{18} 法

Fig.-6 に 500ppb の NDELA を添加した試料についての UV-HPLC クロマトグラムを示す。

セツプバック C_{18} による前処理法は NDELA の回収率も良好であり、操作も非常に簡単で分析時間を大幅に短

Table-4 Analysis of NDELA in model cream

Methods		Conc. of NDELA (ppb)	Recovery* (%)	Detection limit (ppb)
clean up	detection			
silica gel column	ECD-GC	520	95	10
		427	85	5
ion-exchange column	UV-HPLC	483	98	50
SEP-PAK C ₁₈ cartridge	UV-HPLC	524	105	100

* 500 ppb NDELA was added.

Fig.-6 UV-HPLC chromatogram of spiked model cream with 500 ppb NDELA. Sample solution was passed through a SEP-PAK C₁₈ cartridge

縮できる等の特徴がある。しかしその一方、検出限界が 100ppb と比較的低感度であること、及び操作が簡単なだけに妨害物質の除去が不十分になりやすいなどの問題点も残るが、スクリーニング法としては極めて有望であるため、今後更に種々の試料について検討を行なう価値があると思われる。

3.2 NDELA 添加試料の分析

以上三種の方法によって 2.1 の試料、すなわち乳化時に 500ppb の NDELA を完全に混入したクリーム of 分析を行なった結果をまとめたのが **Table-4** である。

500ppb レベルの NDELA は、いずれの分析法を用いても試料中より分離、定量することができ、500ppb 前後の良好な値が得られているのがわかる。また、更に微

量の NDELA の分析も検討し、その結果を **Table-5** に示した。

Table-5 Analysis of NDELA in model cream by ECD-GC at low level

Sample	Conc. of NDELA (ppb)		Recovery (%)
	OV-275	OV-17+DC QF-1	
A	118	92.5	89.1
	57.7	63.1	
B	249.1	248.9	92.7
	247.3	245.2	

A : 100ppb NDELA was added at emulsification.

B : 300ppb

〃

試料 A は乳化時に 100ppb、試料 B は 300ppb の NDELA を添加したものである。シリカゲルクロマト法で前処理し定量は ECD-GC にて行なったが、試料 B では添加量の 300ppb に対して、若干値は低いながらばらつきの少ない比較的良好な結果が得られたのに対して、試料 A では値がばらつき、再現性の点で問題があった。このように微量の NDELA の分析には操作時の誤差が分析値に大きく影響し、正確な値が得られ難い。また、実際に市販の化粧品中の NDELA の分析を行なう場合には、香料、色素の影響や処方 の多様化によって妨害ピークが出現する可能性もあるので、スクリーニング法という意味においては 500ppb レベルの NDELA をチェックできればよいのではと考えている。

次いで、形態の異なる化粧品の一つとしてシャンプーについても同様の検討を行なった。処方 は **Table-6** に

示す通りで、クリームと同じく製造時に 500 ppb の NDELA を添加してある。

Table-6 Formula of model shampoo containing 500ppb NDELA

Sodium lauryl sulfate	7.0%
Sodium polyoxyethylene laurylether sulfate (2 E. O.)	6.3
Lauric acid diethanolamide	5.0
Propylene glycol	5.0
Methyl parahydroxybenzoate	0.1
Water, q. s.	100.0
NDELA	500 ppb

シャンプーについては、シリカゲルクロマト法とセップパック C₁₈法で前処理を行ない、その結果を **Table-7** にまとめた。

いずれも回収率が 100 % 前後で、試料からの NDELA の分離、定量も好ましく、ほぼ満足のいく値が得られている。このことから、今回検討したスクリーニング法はクリームに限らず、形態の異なるシャンプー等にも適応可能であると言える。

Table-7 Analysis of NDELA in model shampoo

Methods		Conc. of NDELA (ppb)	Recovery (%)
clean up	detection		
silica gel column	ECD-GC	520	106
SEP-PAK C ₁₈ cartridge	UV-HPLC	486	97

3.3 専門委員会における分析結果

2.1 の試料を専門委員会に配付し、各社所有の分析機器で分析した結果をまとめて **Table-8** に示した。

分析方法は前述の三法の外に、順相H PLCで NDELA 溶出部分を分取し、溶媒留去後、蒸留水で一定量としたのち、ODS系カラムを用いてHPLCで定量する方法、イオン交換樹脂によるクリーンアップと HPLC での分取精製法を組み合わせた方法が新たに検討されている。シリカゲルクロマト法で前処理を行なったところで極端に回収率の低いところが見られるが、これはシリカゲルカラムからの NDELA の溶出が不十分であったためであろう。下段に TEA による分析値を示してあるが、この値と比較してもわかる通り、検出器に TEA を用いずとも、前処理

Table-8 Analysis of NDELA in model cream

Methods		Conc. of NDELA (ppb)	Recovery (%)	
clean up	detection			
silica gel column	ECD-GC	520 , 427	95 , 85	C
		140	36.8	D
		270	61.5	G
	UV-HPLC	570 , 516	49 , 50	B
		167	38.5	D
		377	90	F
ion-exchange column	GC-MS	323 , 340	77	K
	UV-HPLC	483	98	C
	ECD-GC	615	89	D
SEP-PAK C ₁₈ cartridge	UV-HPLC	524	105	C
		519		H
HPLC	UV-HPLC	410		A
		520		E
ion-exchange column/HPLC	UV-HPLC	433	89	D
		446	87	I
silica gel column	TEA-GC	450		J
ion exchange column	TEA-GC	484		J

法の検討をあらかじめ行なえば、500ppb 程度の NDELA のスクリーニングは汎用の分析機器で十分可能であり、TEA に相当する分析値がほぼ相互に一致して得られることがわかった。

4. 総括

TEA 以外の分析法による化粧品中の NDELA のスクリーニング法を NDELA 含有濃度既知のクリーム、シャンプーを試料として用いて検討した。第一法として、試料から NDELA をアセトニトリルで抽出したのちシリカゲルカラムを通してクリーンアップし、更に NDELA をアセチル化して ECD-GC にて定量する方法、第二法として、カチオン交換樹脂、アニオン交換樹脂を用いて NDELA を試料から分離、精製し、蒸留水で一定量として UV-HPLC で定量する方法、更に第三法として、アセトニトリルで抽出後多量の n-ヘキサンで油分を除去し、セップパック C₁₈を通してクリーンアップしてから UV-HPLC で定量する方法を試みた。これら三種の方法はいずれも 300ppb レベルまでは NDELA の回収率も良く、試料からの分析も可能であったが、更に微量の NDELA のスクリーニングになると、操作時の誤差等が分析値に大きく影響して正確な値が得られ難い。また、今回の試料の場合は良好な結果が得られたが、香料あるいは色素が含まれている製品や処方複雑な製品の分析にあたっては、これらの物質が妨害となるか否かに十分注意して分析を行わなければならない。すなわち、市販品の分析にあたっては必ず NDELA 標準品の添加回収実験を並行して行なうことが必要であり、製品形態、処方に応じて適宜分析法を組み合わせたり、また、複数の分析法を試みることも必要であろう。そうすることにより、これらの方法はスクリーニング法として市販品の分析にも十分適応できると考える。

しかし、あくまで今回述べた分析法はスクリーニング法であり、用いた分析機器はいずれも TEA のように NDELA を特異的に検出するものではないため、本法により NDELA を検出した際には TEA MS 等の方法で再確認することが望ましい。

終わりに、分析データを一部提供いただいた専門委員

会関係各位の方々の名簿を掲載し、感謝の意を表します。

㈱伊勢半	高橋 守
花王石鹼㈱	山口 信一郎
鐘紡㈱	米谷 融
サンスター㈱	太田 孝
㈱資生堂	高松 翼, 福田 陽治
㈱ナリス化粧品	箕笹 裕介
ピアス㈱	八木橋 不二夫
ポーラ化成工業㈱	平松 功, 高取 正治
ライオン㈱	沢村 邦夫
龍宝堂製薬㈱	川中 肇
	(五十音順 敬称略)
㈱小林コーセー	小野 正寛, 荒金 久美

文 献

- 1) 竹内正博, 水石和子, 原田裕文, 東京衛研年報, 31, (1) 86 (1980)
- 2) 竹内正博, 水石和子, 原田裕文, ibid., 32 (2), 104 (1981)
- 3) Black et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1474 (1981)
- 4) 竹内正博, 水石和子, 原田裕文, 東京衛研年報 30 (1) 98 (1979)
- 5) Victor, H. Baptist et al., J. Soc. Cosmet., Chem., 31, 219 (1980)
- 6) G. M. Telling, P. C. Dnnnett, Int. J. Cosmet., Sci., 3, 241 (1981)
- 7) I. E. Rosenberg et al., J. Soc. Cosmet. Chem., 31, 237 (1980)
- 8) I. E. Rosenberg et al., ibid., 31, 323 (1980)
- 9) B. Rollmann et al., J. Chrom., 206, 158 (1981)
- 10) 小野正寛, 佐藤信夫, J. Soc. Cosmet. Chem. Japan, 16-1, 43 (1982)
- 11) Black et al., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 64, 1474 (1981)
- 12) Y. Fukuda, Y. Morikawa, I. Matsumoto., Anal. Chem., 53, 2000 (1981)

(昭和58年9月2日受理)