

原 著

## ミセル動電キャピラリー電気泳動法による 化粧品中のパラベン類，ブチルヒドロキシアニソールおよび ジブチルヒドロキシトルエンの同時分析

河辺聡子\*<sup>1</sup> 楊井理恵\*<sup>2</sup> 藤井俊子\*<sup>1</sup>

### 要 約

ミセル動電キャピラリー電気泳動法 (MEKC) を用いて，市販化粧品の防腐剤として用いられるパラベン類 (パラオキシ安息香酸エステル類)，すなわち，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)，イソブチルパラベン (iBP) とパラオキシ安息香酸ベンジル (BeP) および 酸化防止剤として用いられるブチルヒドロキシアニソール (BHA) とジブチルヒドロキシトルエン (BHT) を迅速，かつ，簡単に同時分析した．これら 9 種類の化学物質は，20 mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液に SDS を 30 mM 添加した泳動溶液 (pH 9.35) を用いて 15 kV の定電圧で分析すると，各成分は 11 分以内にそれぞれ分離泳動した．検量線は 5 ~ 80 mg L<sup>-1</sup> の範囲で良好な直線性を示し，相関係数は 0.99 以上であった．併行精度は移行時間ではいずれもきわめて高く [R.S.D. (%) 0.33]，ピーク面積とピーク高の併行精度はパラベン類と BHT の R.S.D. が 10 % 以内であった．検出限界 (mg L<sup>-1</sup>) は，MP が 2.28，EP が 3.28，PP が 2.28，iPP が 3.62，BP が 3.62，iBP が 1.54，BeP が 6.46，BHA が 9.17，BHT が 6.17 であった．本 MEKC を用いて市販化粧品 3 種類について分析したところ，その 1 種類において 5 種類のパラベンおよび BHT を検出した．

### 緒 言

市販化粧品には防腐や酸化防止の目的で医薬部外品である化学物質が多数使用されている．化粧品は人体に直接使用されるものであるため，これら医薬部外品の人体影響については，詳細な情報が求められるようになってきている．そのため，平成 13 年 4 月に薬事法が改正され，これまでは一部しか表示されていなかった化粧品の成分について，全成分を表示することが義務づけられるようになった．

市販化粧品には「パラベン」という表示が多く見られる．パラベンは，パラオキシ安息香酸エステル類の総称で，ほとんどの化粧品に防腐の目的で用いられている．パラベンは，また，加工食品に保存料 (防腐剤) として用いられるが，食品添加物として指定されているのはパラオキシ安息香酸エチル (エチルパラベン，以下，EP)，パラオキシ安息香酸プロピル (プロピルパラベン，以下，PP)，パラオキシ安息香酸イソプロピル (イソプロピルパラベン，以下，iPP)，パラオキシ安息香酸ブチル (ブチルパラベン，以下，BP)，パラオキシ

安息香酸イソブチル (イソブチルパラベン，以下，iBP) の 5 種類である．化粧品の場合はこれら 5 種類以外にパラオキシ安息香酸メチル (メチルパラベン，以下，MP)，パラオキシ安息香酸ベンジル (以下，BeP)，パラオキシ安息香酸メチルナトリウム (以下，Na-MP) 等を一定基準内の濃度で使用できることになっている (化粧品基準 別表第 3，平成 13 年厚生労働省告示 158 号)．パラベンのうち MP，EP，PP および BP は，若干のエストロゲン作用があることなどが報告<sup>1,2)</sup> されているため，パラベンの種類についての情報も消費者に必要であると考えられる．そこで，Fujii ら<sup>3)</sup> は，食品中の 5 種類のパラベン (EP，PP，iPP，BP，iBP) がキャピラリー電気泳動法 (以下，HPCE) のうちドデシル硫酸ナトリウム (以下，SDS) を用いるミセル動電キャピラリー電気泳動法 (Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis，以下，MEKC) により同時分析できることを報告し，市販飲料中の保存料として BP が使用されているものがあることなどを認めている．高速液体クロマトグラフ法 (以下，HPLC) によるパラベン

\*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 \*2 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻 (連絡先) 河辺聡子 〒701-0193 倉敷市松島 288 川崎医療福祉大学

類の分析法としては、De Kruijfら<sup>4)</sup>が化粧品中のパラベンについてMP, EP, PPおよびBPの4種類について、また、Maedaら<sup>5)</sup>はMP, PP, iPP, BPおよびiBPの5種類について報告している。しかし、HPLCの分析法はHPCEとくらべて分析時間がかなり長くなること、グラジエント法を用いるなど操作が煩雑であること、また、分析用試薬量が多いことなどが短所である。一方、Shu-Pingら<sup>6)</sup>は、HPCEのうちSDSを泳動溶液に用いない中空キャピラリー電気泳動法(Capillary Zone Electrophoresis, 以下、CZE)でMP, EP, PPおよびBPを10分以内に同時分析できることを報告しているが、CZEでは、プロピルエステル、ブチルエステルのノルマル体と、イソ体の分離ができないことが化粧品のパラベンの分析法としては難点である。

一方、化粧品の医薬部外品は139種類にもおよんでいるが、酸化防止剤の目的で使用されるものとして、ブチルヒドロキシアニソール(以下、BHA)、ジブチルヒドロキシトルエン(以下、BHT)等がある。これまでもBHAとBHTの毒性について報告<sup>7)</sup>され、最近ではBHAの環境ホルモン作用についても報告<sup>8)</sup>されている。したがってBHAやBHTは使用について問題視されることが多い化学物質である。

一般に市販化粧品には、パラベン類とBHAまたはBHTとの同時使用が行われている実態があると思われるので、今回、パラベン類、BHAおよびBHTのMEKCによる同時分析法の確立を目的として、先ず、分析法バリデーションを実施した。さらに、市販化粧品中のパラベンの種類の同定と各パラベン濃度の測定を行い、あわせてBHTの濃度を測定したので報告する。

## 方 法

### 1. 試薬

四ホウ酸ナトリウム( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , MW=381.37, 試薬特級),  $\gamma$ -シクロデキストリン( $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$ )<sub>7</sub>, MW=1135.00, 試薬一級, 以下  $\gamma$ -CD), SDS [ $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ , MW=288.38, 試薬一級], BHA [2-and 3-Tert-Butyl-4-Hydroxyanisole,  $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_2$ , MW=180.25], BHT [3,5-Di-Tert-Butyl-Hydroxytoluene,  $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ , MW=220.35]および没食子酸プロピル[(HO)<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>COOCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, MW=212.20, 和光一級, 以下PG]は、和光純薬工業株式会社製を、蒸留水(HPLC用), エタノール( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , MW=46.07, 試薬特級), アセトニトリル( $\text{CH}_3\text{CN}$ , MW=41.05, HPLC用), メタノール( $\text{CH}_3\text{OH}$ , MW=32.04, HPLC用)はナカライテスク株式会社

製を、MP( $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOCH}_3$ , MW=152.15), EP( $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOC}_2\text{H}_5$ , MW=166.17), PP [ $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , MW=180.20], iPP [ $\text{HO C}_6\text{H}_4\text{COOCH}(\text{CH}_3)_2$ , MW=180.20], BP [ $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , MW=194.23]およびiBP [ $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOCH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$ , MW=194.23]は、東京化成工業株式会社製を、BeP( $\text{HOC}_6\text{H}_4\text{COOC H}_2\text{C}_6\text{H}_5$ , MW=228.25)は、関東化学株式会社製を用いた。

### 2. 試薬調製法

標準溶液の調製: 7種類のパラベンMP, EP, PP, iPP, BP, iBPおよびBePをそれぞれ10.0mgずつ秤取りし、少量の50%メタノール溶液で溶解後10mLに定容し標準原液とした。BHAとBHTは、それぞれ10.0mg秤量し、エタノールとアセトニトリルの等量溶液(以下、溶媒Aとする)の少量を用いて溶解後、溶媒Aで10mLに定容し標準原液とした。標準溶液は、分析時に標準原液から50%メタノール溶液を用いて希釈し、メンブランフィルター(DISMIC-25, 孔径0.20  $\mu\text{m}$ , 東洋濾紙株式会社製)を用いてろ過後、超音波洗浄器で10分間脱気した。

泳動溶液の調製: 泳動溶液には、四ホウ酸ナトリウム0.763g(20mM)に少量の蒸留水を加えてスターラーを用いて溶解し、100mLに定容した(pH 9.35)。この液にSDSを0.865g(30mM)添加し、スターラーを用いて溶解した。その後、メンブランフィルターを用いて濾過し、超音波洗浄器で30分間脱気したものを泳動溶液とした。

### 3. 分析装置および分析条件

分析装置: フォトダイオードアレイ検出器(512ch)付きキャピラリー電気泳動装置(CAPI-3001, 大塚電子株式会社製); キャピラリー, 融融シリカ製(75  $\mu\text{m}$  I.D.  $\times$  500 mm L.)。

分析条件: 15 kV定電圧; 測定温度, 25 ; 測定波長, 200nm; 注入量, 約10 nL(落差方式, 15 mm  $\times$  30 sec)。

### 4. 分析法バリデーション

検量線の作成: 7種類のパラベン, BHAおよびBHTのいずれも5~80 mg L<sup>-1</sup>の濃度範囲でピーク面積による5点検量を行い、回帰直線と相関係数を求めた。

検出限界(LOD): ノイズの平均値の3倍値をシグナルとして、検量線より検出限界濃度を算出した。

併行精度(Repeatability): 7種類のパラベン, BHAおよびBHTの混合溶液(各50 mg L<sup>-1</sup>)について、つづけて9回分析操作を行った。移行時間, ピーク面積, ピーク高について相対変動係数(Relative Standard

Deviation , 以下 , R.S.D. ) を求め併行精度とした .

### 5 . 試料および分析用試料溶液調製法

分析用試料として , 以下の 3 種類の化粧品 ( A , B , C ) を用いた .

A : P 社製 化粧水 , B : J 社製 液体洗顔料 , C : S 社製 化粧用クリーム .

試料溶液調製法 : A および B は 20mL 容試験管に 1 mL ずつ秤取し , エタノールを 1 mL 加え 1 分間混和した . その後 50% メタノール 8 mL を加え分析用試料溶液とした . C は , 20mL 容試験管に試料を 1 g 秤取し , エタノール 3 mL を加え 1 分間混和した . その後 50% メタノール 6 mL を加え , 遠心分離 ( 3,000 r.p.m. , 10 分間 ) 後 , 上澄を分析用試料溶液とした . 試料溶液は , メンブランフィルターを用いてろ過し , 超音波洗浄器で 10 分間脱気後分析に供した .

## 結果および考察

### 1 . エレクトロフェログラム

PG を内部標準として 7 種類のパラベン , BHA および BHT の計 9 種類の標準溶液 ( 各 20 mg L<sup>-1</sup> ) を泳動し , 図 1 にエレクトロフェログラムと各ピークの紫外外部吸収曲線を示す . 図 1 では BeP と BHA

の泳動時間が近く , それらの分離に若干の難があるが , 7 種類のパラベンと BHA および BHT は 11 分以内に分離泳動することが認められた . 泳動溶液の SDS 濃度を 20 , 25 , 30 および 50mM にして標準溶液を泳動した結果 , 30mM SDS 添加 20mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液を用いた場合 , パラベン類 , BHA および BHT の分離が最も良いことが認められた . BHA と BHT の同時分析において 15 mM  $\beta$ -CD を 25 mM SDS 添加 20mM 四ホウ酸ナトリウム緩衝液を用いた MEKC<sup>9)</sup> では , BHA と BHT の泳動時間 ( 分 ) は 5.5 と 9.3 となり , 今回の成績より分析時間が若干短かった . しかし , パラベン類の同時分析において  $\beta$ -CD を添加すると各パラベンの分離が悪くなることが認められている<sup>10)</sup> ので ,  $\beta$ -CD の添加は行わなかった .

### 2 . 回帰直線と検出限界

各標準物質について 5 ~ 80 mg L<sup>-1</sup> の濃度範囲で , ピーク面積による回帰直線と相関係数を求めた結果を表 1 に示す . パラベン , BHA および BHT はいずれも良好な直線性が認められ , 相関係数もきわめて高かった .

表 2 にサンプル別の LOD を濃度 ( mg L<sup>-1</sup> ) と量 ( pg = 10<sup>-12</sup>g ) で示す . Shu-Ping ら<sup>4)</sup> の CZE による成績では ng で表わされており , MP が 0.97 , EP が 1.09 , PP が 1.22 , BP が 1.33 となっているが , 本

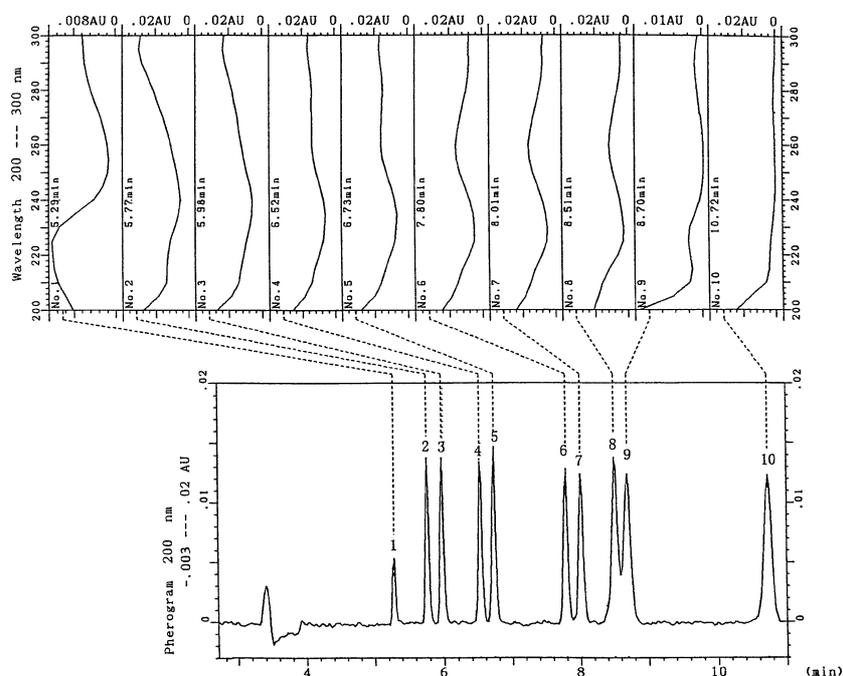


図 1 Electropherogram and UV spectra of the mixed standard solution of parabens and antioxidants . Peaks : 1 , propyl gallate ( internal standard ) ; 2 , methyl-paraben ( MP ) ; 3 , ethyl-paraben ( EP ) ; 4 , isopropyl-paraben ( iPP ) ; 5 , propyl-paraben ( PP ) ; 6 , isobutyl-paraben ( iBP ) ; 7 , butyl-paraben ( BP ) ; 8 , benzyl-paraben ( BeP ) 9 , butylated hydroxyanisole ( BHA ) ; 10 , butylated hydroxytoluene ( BHT ) .

成績による LOD は Shu-Ping らの成績とくらべてかなり小さく  $1/30 \sim 1/50$  の値であった。

表1 Calibration graphs of parabens and antioxidants by MEKC.

Compound <sup>1</sup>	Regression line	r	Range (mg L <sup>-1</sup> )
MP	$y = 1.02x + 0.90$	0.9976	5~80
EP	$y = 0.94x + 1.49$	0.9981	5~80
PP	$y = 1.01x + 2.30$	0.9978	5~80
iPP	$y = 1.04x + 1.16$	0.9987	5~80
BP	$y = 1.09x + 5.27$	0.9984	5~80
iBP	$y = 0.99x + 2.82$	0.9952	5~80
BeP	$y = 0.80x - 3.59$	0.9933	5~80
BHA	$y = 1.55x + 4.86$	0.9996	5~80
BHT	$y = 2.50x + 8.36$	0.9959	5~80

1: See text for abbreviations.  $y$ , peak area  $\times 10^{-6}$ ;  $x$ , concentration (mg L<sup>-1</sup>);  $r$ , correlation coefficient.

表2 Limits of detection of parabens and antioxidants by MEKC.

Compound <sup>1</sup>	Limits of detection	
	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )	Amount (pg)
MP	2.28	22.8
EP	3.28	32.8
PP	2.28	22.8
iPP	3.62	36.2
BP	3.62	36.2
iBP	1.54	15.4
BeP	6.46	64.6
BHA	9.17	91.7
BHT	6.17	61.7

1: See text for abbreviations.

### 3. 併行精度

表3に併行精度を示す。移行時間の併行精度 (R.S.D., %) は、0.19~0.33の範囲であった。ピーク面積およびピーク高の併行精度は、パラベン類とBHTは10%以内であったが、BHAの場合ピーク面積、ピーク高ともに併行精度が低く、BHAの分析には問題が残るため今後の検討課題とする。

### 4. 化粧品中のパラベンとBHTの分析

図2にサンプルAのエレクトロフェログラムと吸収曲線を示す。サンプルAにはパラベンとBHTの表示があった。図2に示されるように、ピーク1の移行時間および吸収曲線からみて使用されているパラベンはMPであることが明らかとなった。BHTについては、ピークが認められなかったため、検出限界以下の濃度で使用されているものと考えられる。図3にサンプルBのエレクトロフェログラムと吸収曲線を示す。サンプルBには、パラベンとBHTの表示があり、そのうちパラベン5種類 (MP, EP, PP, BP, iBP) とBHTが使用されていることが認められた。図4にサンプルCのエレクトロフェロ

グラムと吸収曲線を示す。サンプルCには表示通りMPとBPのピークが認められた。

表4に各サンプルのパラベンとBHT濃度を示す。各サンプルのパラベン濃度はすべて基準値 (100 g中に1.0 g) よりかなり低い濃度で使用されていることが認められた。

Shu-Ping ら<sup>4)</sup> は、11種類の市販化粧品用クリーム中のパラベンをCZEを用いて分析し、パラベン4種類のうちではMPが最も多く使用されていることを述べている。本成績においても、MPはすべてのサンプルに使用されていた。著者らが、市販化粧品の表示について市場調査を行ったところ、パラベンの種類が表示されている場合はきわめて稀であった (著者ら、未発表データ)。MPは食品添加物のパラベンとして指定されていないことなどを考慮すると、化粧品の場合は特にMPは表示されるべきではないと思われる。

表3 Repeatability for MEKC.

Compound <sup>1</sup>	Relative standard deviation (%)		
	Migration time	Peak area	Peak height
MP	0.19	6.83	9.73
EP	0.22	7.03	7.48
PP	0.33	6.91	5.36
iPP	0.30	6.40	6.25
BP	0.30	5.51	5.12
iBP	0.31	6.95	5.39
BeP	0.26	3.82	5.88
BHA	0.33	12.38	21.37
BHT	0.32	7.16	2.92

1: See text for abbreviations.

表4 Concentrations of parabens and BHT in three cosmetic products.

Compound <sup>1</sup>	Concentration (mg L <sup>-1</sup> )		
	Sample A	Sample B	Sample C
MP	25.7 ± 2.4	59.9 ± 4.8	127.7 ± 10.1
EP	ND	21.8 ± 4.8	ND
PP	ND	13.9 ± 2.6	ND
BP	ND	25.6 ± 0.6	49.3 ± 9.8
iBP	ND	12.2 ± 1.3	ND
Total parabens	25.7 ± 2.4	133.4 ± 14.1	177.0 ± 19.9
BHT	ND	63.8 ± 1.8	ND

1: See text for abbreviations. mean ± SD, n=3. ND: Not detected.

平成12年厚生省告示第332号によると、BHTについては使用量の基準が設定されていない。今回は、調査した化粧品3種類のうち1種類にはBHTの使用が確認できた。BHTは化粧品への使用頻度は比較的高いと思われる (著者ら、未発表データ) ので、今後BHTについての使用量基準の設定が望まれる。

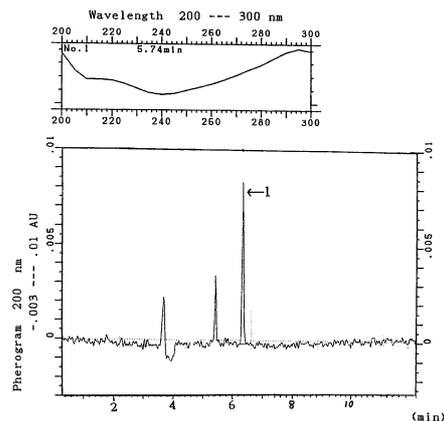


図2 Electropherogram and an UV spectrum of methylparaben (Peak 1) in sample A .

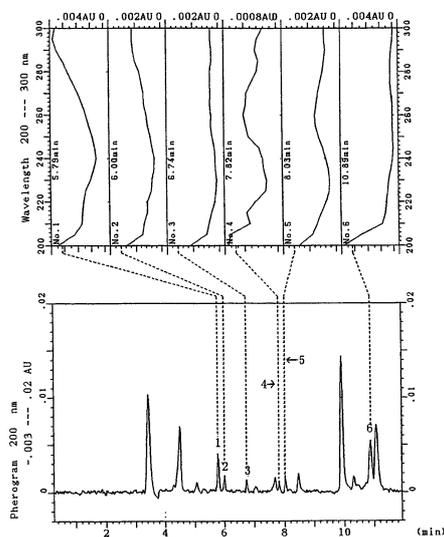


図3 Electropherogram and UV spectra of five parabens and BHT in sample B . Peaks : 1 , MP ; 2 , EP ; 3 , PP ; 4 , iBP ; 5 , BP ; 6 , BHT . See the legend of Fig.1 for abbreviations

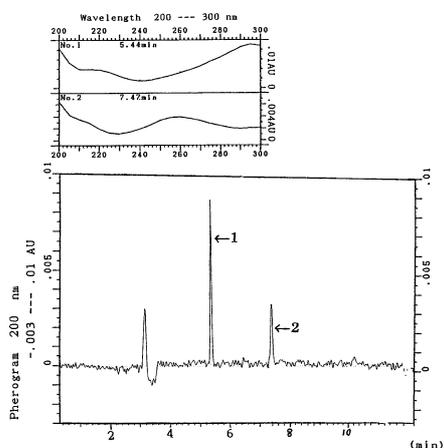


図4 Electropherogram and UV spectra of methylparaben and butylparaben in sample C. Peaks : 1 , MP ; 2 , BP . See the legend of Fig.1 for abbreviations

## 文 献

- 1) Routledge EJ, Parker J, Odum J, Ashdy J and Sumpter JP : Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) are Estrogenic . *Toxicology and Applied Pharmacology* , **153** , 12-19 , 1998 .
- 2) Hossaini A ,Larsen JJ and JC :Lack of Oestrogenic Effects of Food Preservatives (Parabens) in Uterotrophic Assays .*Food and Chemical Toxicology* , **38** , 319-323 , 2000 .
- 3) Fujii T ,Kawabe S : Simultaneous Determination of Sodium Benzoate and p-Hydroxybenzoate Esters Using High-performance Capillary Electrophoresis . *Kawasaki Journal of Medical Welfare* , **7**(1) , 33-41 , 2001 .
- 4) N De Kruijf ,A Schouten ,M A H Rijk ,L A Pranoto-Soetardhi : Determination of preservatives in cosmetic products II . High-performance liquid chromatographic identification . *Journal of Chromatography* **A69** 317-328 , 1989 .
- 5) Maeda Y ,Yamamoto M ,Owada K ,Sato S ,Masui T : High-performance liquid chromatographic determination of six p-hydroxybenzoic acid esters in cosmetics using sep-pak florisol cartridges for sample pre-treatment . *Journal of Chromatography* , **410** , 413-418 , 1987 .
- 6) Shu-Ping W ,Ching-Li C : Determination of parabens in cosmetic products by supercritical fluid extraction and capillary zone electrophoresis . *Analytica Chimica Acta* . **377** , 85-93 , 1998 .
- 7) Ito N ,Hagiwara A ,Shibata M ,Ogiso T and Fukushima S : Induction of squamous cell carcinoma in the forestomach of F344 rats treated with butylated hydroxyanisole . *Gann* , **73**( 2 ) , 332-334, 1982 .
- 8) Bao TZ ,Joseph L ,Robert TR and Allan HC : Effect of Dietary 2(3)-tert-Butyl- 4 -hydroxyanisole on the Metabolism and Action of Estradiol and Estrone in Female CD- 1 Mice . *Cancer Research* , **57** , 2419-2427, 1997 .
- 9) 河辺聡子, 藤井俊子 : フェノール性酸化防止剤の同時分析—高速液体クロマトグラフ法, キャピラリー電気泳動法およびガスクロマトグラフ法による比較— . 川崎医療福祉学会誌 , **11**( 1 ) , 133-139, 2001 .
- 10) 河辺聡子 : 食品および生体試料中の微量成分の定量法に関する研究 . 平成12年度 川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科修士 ( 臨床栄養学 ) 論文, 2000 .

( 平成14年10月31日受理 )

## Simultaneous Determination of Parabens, Butylated Hydroxyanisole and Butylated Hydroxytoluene in Cosmetic Products Using Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis

Satoko KAWABE, Rie YANAI and Toshiko FUJII

(Accepted Oct. 31, 2002)

Key words : MICELLAR ELECTROKINETIC CAPILLARY ELECTROPHORESIS  
(MEKC), PARABENS, BUTYLATED HYDROXYANISOLE, BUTYLATED  
HYDROXYTOLUENE, COSMETICS.

### Abstract

A rapid and simple micellar electrokinetic capillary electrophoresis method was developed for the simultaneous determination of the parabens, methyl-, ethyl-, propyl-, isopropyl-, butyl-, isobutyl- and benzyl p-hydroxybenzoate and two phenolic antioxidants, butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene, which were widely used in cosmetic products.

The nine chemicals were successfully separated within 11 minutes using a 20 mM tetraborate buffer containing 30 mM sodium dodecyl sulfate (pH 9.35) with a constant voltage of 15 kV. The correlation coefficients of the linear calibration graphs for these chemicals exceeded 0.99 in concentrations ranging between five and 80 mg L<sup>-1</sup>. The repeatability of the migration times of the chemicals was satisfactory [R.S.D.(%) 0.33], under optimum separation conditions, and peak areas and heights had R.S.D. values less than 10 %. The detection limits (mg L<sup>-1</sup>) were 2.28 for MP, 3.28 for EP, 2.28 for PP, 3.62 for iPP, 3.62 for BP, 1.54 for iBP, 6.46 for BeP, 9.17 for BHA and 6.17 for BHT.

Using the present method, five kinds of parabens and butylated hydroxytoluene were detected in one of three commercial cosmetics.

Correspondence to : Satoko KAWABE

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions,  
Kawasaki University of Medical Welfare  
Kurashiki, 701-0193, Japan  
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.12, No.2, 2002 349-355)