

添加し、内部標準法による定量測定を行った。

結果を表 2 に示す。回収率は約 650% となった。検液の粘性の影響はないと判明した。製品中の成分により発光が増強されている可能性が考えられた。

4. 7 種金属での検討

水銀の添加回収試験において見られた発光の増強が他の金属でも見られるか、化粧品中の含量が問題になることの多いヒ素、カドミウム、コバルト、クロム、ニッケルおよび鉛について検討した。試料量は 5.0 g とし、Hg、As、Cd、Co、Cr、Ni および Pb を 1 ppm 添加した。検液中ではいずれも 0.2 ppm である。

表 3 に結果を示す。Hg のみ回収率が 1,000% となり、他の金属は 100% 以下であった。発光の増強は Hg においてのみ見られることが判明した。

5. 6 種製品での検討

他の化粧水でも Hg の発光の増強が見られるか検討した。製品 A、B、C、D、E および F を 5.0 g ずつ用い、添加濃度は 1 ppm (検液中 0.2 ppm) とした。

表 4 に結果を示す。いずれの製品でも回収率は 100% を超えた。しかし、製品間で大きな差が見られた。増強効果は製品によって異なることが判明した。

6. 標準添加法による製品中水銀濃度の測定

製品により Hg の発光の増強効果が異なり、また、同一の製品でも検液調製のたびに増強効果が異なることがわかった。そこで、製品中の Hg 含有量測定を標準添加法を採用して測定した。試料量は 5.0 g とし、製品 A には 0、0.5、1.0、1.5 ppm (検液中それぞれ 0、0.1、0.2、0.3 ppm) の Hg を、製品 B、C、D、E および F には 0、0.25、0.50、0.75 ppm (検液中それぞれ 0、0.05、0.1、0.15 ppm) の Hg を添加した。

まず、製品 A について定量条件決定測定を行った。標準溶液として 2 ppm Hg、ブランクとして 12% 硝酸、典型試料として 1 ppm の Hg を添加した製品 A の検液 (検液中 Hg 濃度 0.2 ppm) を用いた。図 1 に結果を示す。0.2 ppm の典型試料と 2 ppm の標準溶液のピーク高さがほぼ同じであり、発光の増強が起きていることがわかる。

次に製品 A に 0、0.5、1.0、1.5 ppm の Hg を添加して調製した検液について標準添加法による定量測定を行った。図 2 に検量線を示した。検量線の式は

$$\text{強度} = 7772 \times \text{濃度} + 156.9$$

であり、Hg を添加しない検液中の Hg 濃度は 0.020 ppm と計算された。したがって、製品 A 中の Hg 含量は 0.10 ppm である。

次に製品 B について定量条件決定測定を行った。標準溶液として 1 ppm Hg、ブランクとして 12% 硝酸、典型試料として 0.75 ppm の Hg を添加した製品 B の検液 (検液中 Hg 濃度 0.15 ppm) を用いた。図 3 に結果を示す。0.15 ppm の典型試料のピーク高さが 1 ppm の標準溶液のそれより大きく、発光の増強が起きていることがわかる。

次に製品 B に 0、0.25、0.5、0.75 ppm の Hg を添加して調製した検液について標準添加法による定量測定を行った。図 4 に検量線を示した。検量線の式は

$$\text{強度} = 13558 \times \text{濃度} + 1.400$$

であり、Hg を添加しない検液中の Hg 濃度は 0.0001 ppm と計算された。したがって、製品 A 中の Hg 含量は 0.0005 ppm である。

製品 C、D、E および F について B と同様の測定を行った。図 5、7、9 および 11 に定量条件決定測定の結果を、図 6、8、10 および 12 に検量線を示す。製品中の Hg 濃度を表 5 に示す。製品 D では製品中含量が約 2 ppm であった。他の製品については Hg 含量は非常に低かった。

D. 考察

化粧品中の水銀濃度の測定法としては冷蒸気還元気化原子吸光法、冷蒸気還元気化原子蛍光法（CVAFS）などが挙げられるが、操作が煩雑である。一方、ICP 質量分析法（ICP/MS）により、美白クリーム中に意図的に配合された水銀を測定する方法が報告されている。ICP/MS は選択的定量法として優れているが、装置が高価であるため、普及させるのは困難である。

そこで、簡便な検液調製法を用いて調製した検液について、ICP 発光分析法で定量することを試みた。発光線により元素の識別が可能であるため、個別金属の選択的定量法として応用できる可能性もある。

はじめに定量下限を BEC として算出したところ、ICCR Traces WG の勧告で設定している 1 ppm より低いことがわかった。

続いて、比較的少量に使用することが考えられ、簡便な調製法でも固形の妨害物質が生成しにくいと考えられる化粧品をモデル製品として検討した。はじめに添加回収試験を行ったところ、驚くべきことに標準溶液より大きいピークとして検出されることが分かった。

内部標準物質を用いても同様であったことから、調製した検液中に含まれる何らかの成分により発光が増強していると考えられた。さらに、他の化粧品では増強の程度が異なること、同じ化粧品でも調製する日が異なると増強の程度が異なることから、製品中の Hg 含量を求めるには標準添加法を行う必要があると考えられた。増強をもたらす成分の同定は今後の検討課題である。また、前処理法により影響を低減することが重要と考えられる。

6 種類の化粧品について標準添加法で定量を試みたところ、1 製品について約 2 ppm の Hg が含有されるとの結果を得た。しかし、図 7 に示すように、この製品は成分による発光の増強が小さ

いため、誤差が大きい可能性がある。より選択制の高い方法で再検討する必要がある。

E. 結論

硝酸溶液と混合する簡便な方法を用いて調製した検液について ICP 発光分析を行うことにより、Hg の検出ができることが示された。

化粧品をモデル製品として使用したところ、製品により Hg の発光が増強され、高感度に検出できる場合があった。この特徴により、定量は標準添加法に限られることが判明した。

国内で製造される 6 種の化粧品について標準添加法で定量したところ、5 製品については Hg 含量は非常に小さかったが、1 製品で ICCR Traces WG の勧告で設定している 1 ppm を超える結果となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

I. 参考文献

内野正, 五十嵐良明, 徳永裕司, 化粧品に配合が禁止されている成分の分析法に関する研究: 水銀, 国立医薬品食品衛生研究所報告, 125, 86-88 (2007).

表1. 添加回収試験(添加濃度検液中1 ppm相当).

| 検液 | 検液中濃度 (ppm) | | | 回収率 (%) |
|----|-------------|------|------|---------|
| | 測定1 | 測定2 | 平均 | |
| 1 | 6.73 | 7.24 | 6.99 | 699 |
| 2 | 7.07 | 7.41 | 7.24 | 724 |

表2. 内部標準物質を使用した添加回収試験.

| 添加Hg濃度 (ppm) | 検液中添加Hg濃度 (ppm) | 検液中Hg濃度 (ppm) | | | 回収率 (%) |
|--------------|-----------------|---------------|------|------|---------|
| | | 測定1 | 測定2 | 平均 | |
| 0 | 0 | 0.33 | 0.28 | 0.31 | - |
| 1 | 0.2 | 1.21 | 1.39 | 1.30 | 649 |

表3. 7種の金属の添加回収試験(添加濃度検液中0.2 ppm).

| 元素 | 検液中Hg濃度 (ppm) | | | 回収率 (%) |
|----|---------------|------|------|---------|
| | 測定1 | 測定2 | 平均 | |
| Hg | 2.32 | 1.93 | 2.12 | 1061 |
| As | 0.18 | 0.16 | 0.17 | 86 |
| Cd | 0.18 | 0.18 | 0.18 | 90 |
| Co | 0.15 | 0.13 | 0.14 | 69 |
| Cr | 0.16 | 0.15 | 0.15 | 75 |
| Ni | 0.11 | 0.11 | 0.11 | 54 |
| Pb | 0.20 | 0.17 | 0.18 | 91 |

表4. 6種の製品における水銀の添加回収試験(添加濃度検液中0.2 ppm)

| 製品 | 検液中Hg濃度 (ppm) | | | | 回収率 (%) |
|----|---------------|------|------|------|---------|
| | 測定1 | 測定2 | 測定3 | 平均 | |
| A | 0.99 | 0.86 | 0.84 | 0.93 | 465 |
| B | 0.89 | 0.76 | 0.64 | 0.83 | 413 |
| C | 2.18 | 2.22 | 2.16 | 2.20 | 1100 |
| D | 0.30 | 0.44 | 0.40 | 0.37 | 185 |
| E | 2.36 | 2.34 | 2.25 | 2.35 | 1174 |
| F | 0.45 | 0.40 | 0.33 | 0.43 | 213 |

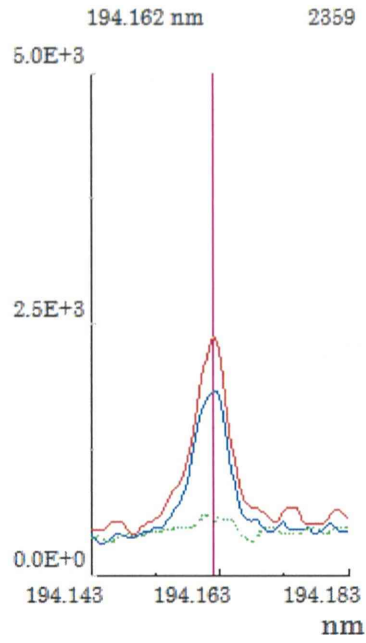


図 1. 製品 A の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

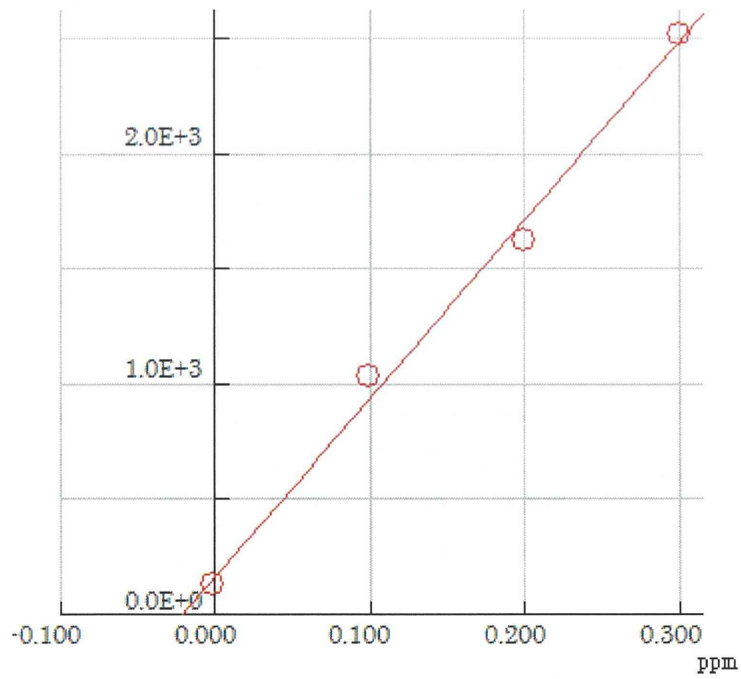


図 2. 製品 A の検量線. 式:強度=7772×濃度+156.9.

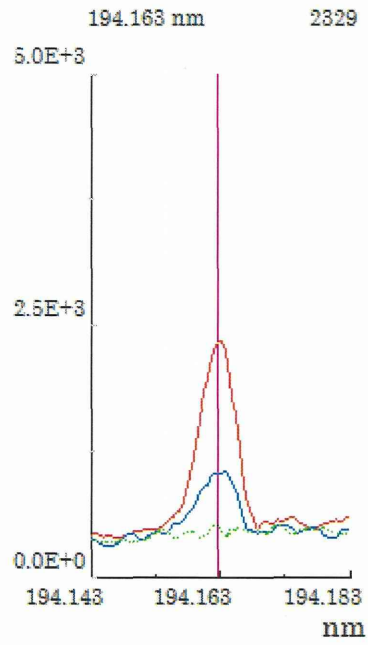


図 3. 製品 B の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

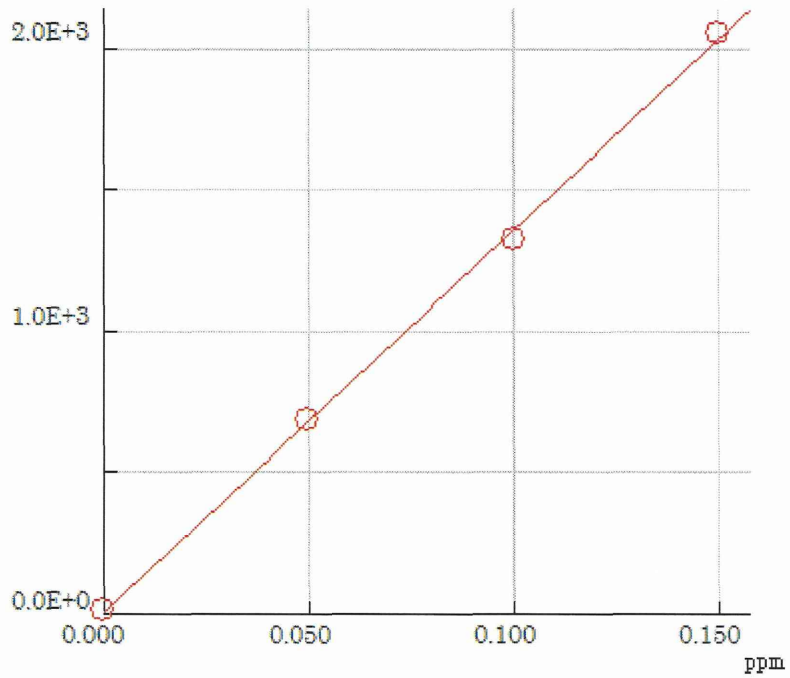


図 4. 製品 B の検量線. 式:強度 = 13558 × 濃度 + 1.400.

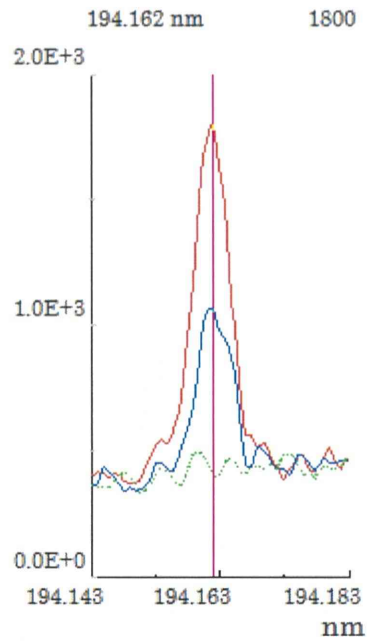


図 5. 製品 C の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

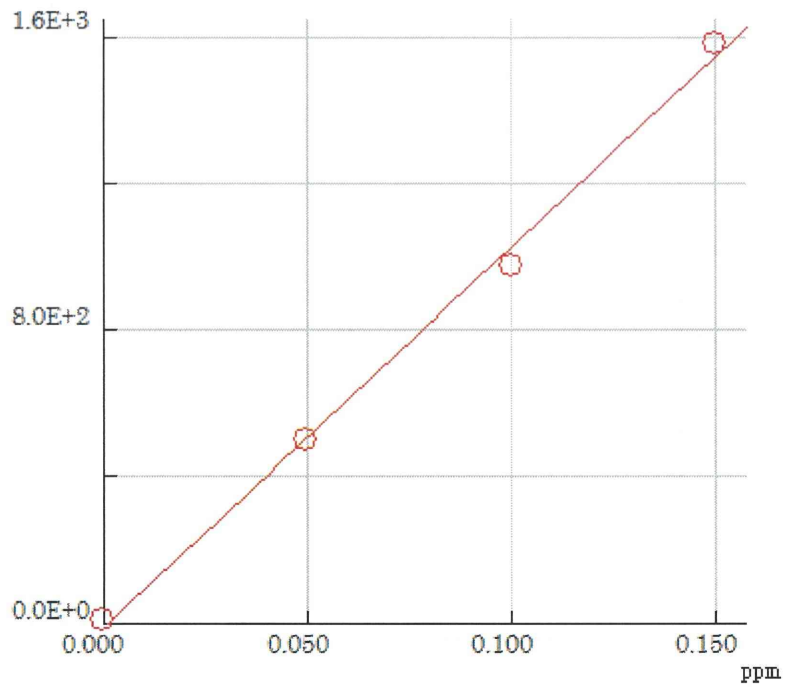


図 6. 製品 C の検量線. 式:強度=10413×濃度-14.17.

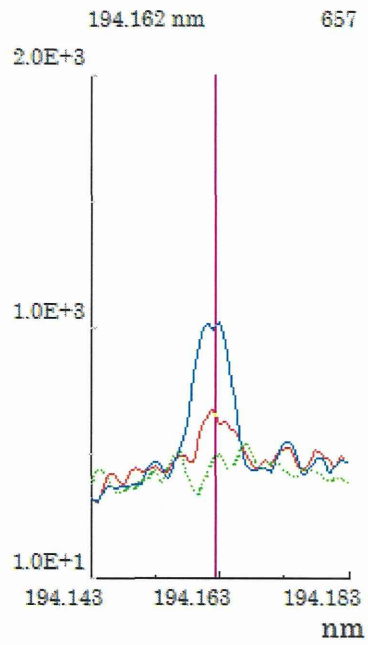


図 7. 製品 D の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

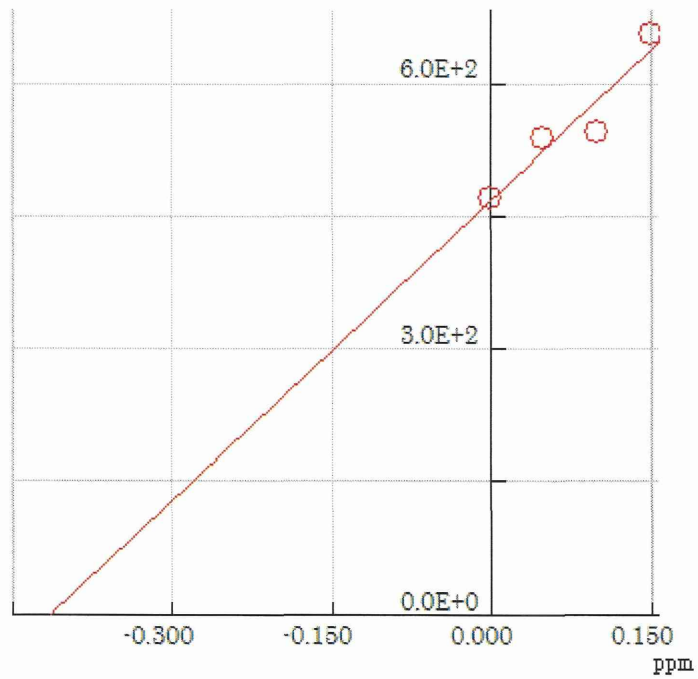


図 8. 製品 D の検量線. 式:強度 = 1133 × 濃度 + 468.17.

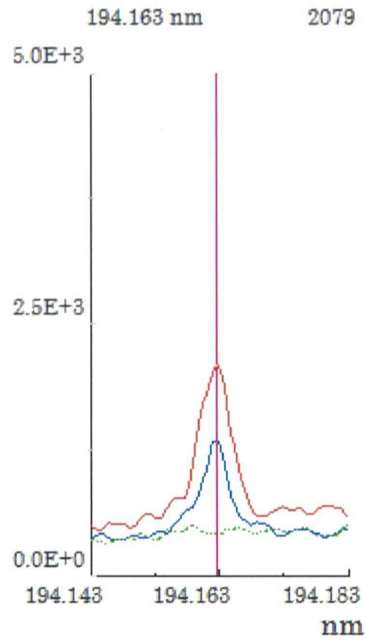


図 9. 製品 E の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

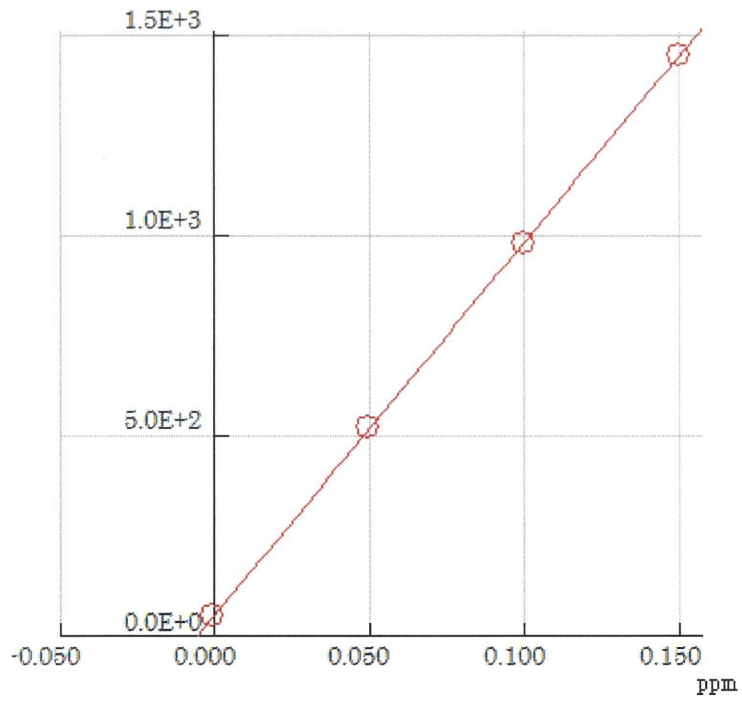


図 10. 製品 E の検量線. 式:強度=9347×濃度+48.23.

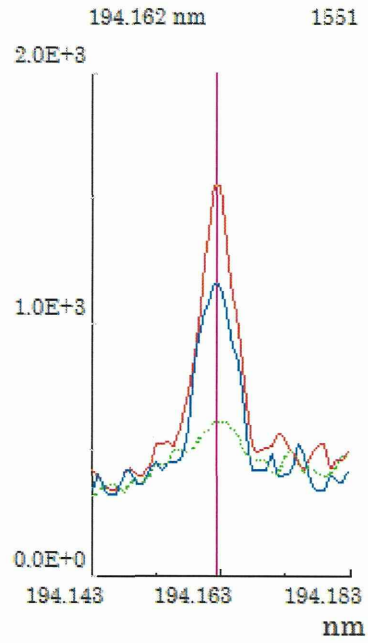


図 11. 製品 F の定量条件決定測定. 青線:標準溶液. 緑線:ブランク. 赤線:添加検液.

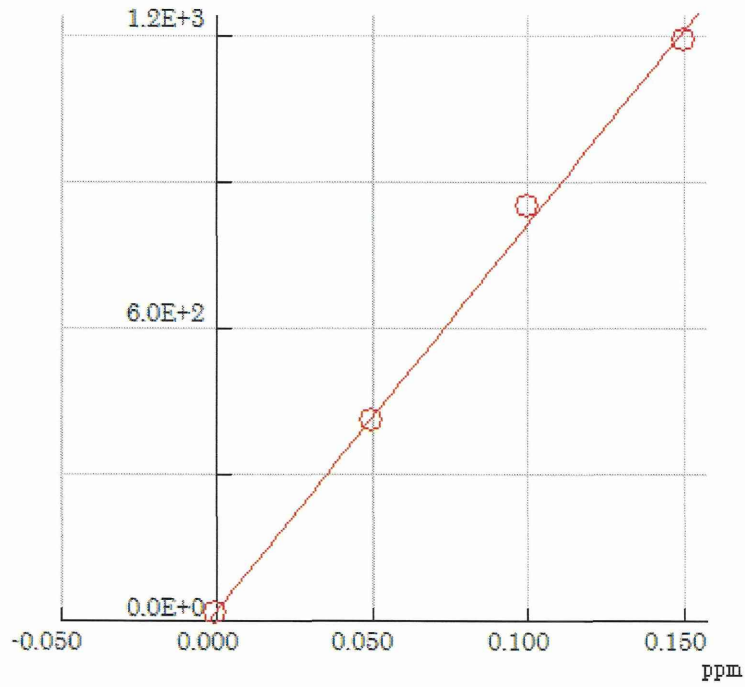


図 12. 製品 F の検量線. 式:強度=7946×濃度+19.80.

表5. 6種の製品中の水銀濃度.

| 製品 | 検液中Hg濃度 (ppm) | 製品中Hg濃度 (ppm) |
|----|------------------|------------------|
| A | 0.0020 | 0.010 |
| B | 0.0001 | 0.001 |
| C | 0.0000 | 0.000 |
| D | 0.4131 | 2.066 |
| E | 0.0052 | 0.026 |
| F | 0.0025 | 0.013 |

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

| 著者氏名 | 論文タイトル名 | 書籍全体の編集者名 | 書籍名 | 出版社名 | 出版地 | 出版年 | ページ |
|-------|------------------------|-----------------|------------------|-------------|-----|------|---------|
| 五十嵐良明 | 3.2香粧品試験法、 3.2.8不純物 | (公社)日本薬学会 編集 | 衛生試験法・注解 2015 | 金原出版 (株) | 東京 | 2015 | 726-731 |
| | | | | | | | |

IV. 研究成果の刊行物・別刷

種類および配合量は「化粧品基準」(厚生省告示平成12年9月29日第331号)の別表第2により頭部、粘膜部または口腔内に使用される化粧品およびその他の部位に使用される化粧品で脂肪族低級一価アルコール類を含有する化粧品の場合、100g中の最大配合量は合計量として20000国際単位であり、それ以外の化粧品の場合、100g中の最大配合量は合計量として50000国際単位である(文献1)。

2) カラムとしてTSKgel ODS-80 T_M(東ソー)を用いたときのクロマトグラムを図Iに示した。パラオキシ安息香酸ブチルとエストラジオールの分離度は1.7であり、両者は十分に分離する(文献2)。

3) 卵胞ホルモンの蛍光強度は励起波長285nmで最大となる。励起波長として290nmを用いた場合、卵胞ホルモンの傾向強度の低下は約20%であるのに対し、パラオキシ安息香酸エステル類の蛍光強度は半減することから、本法では励起波長290nmを用いた。

文献

- 1) 厚生省告示平成12年9月29日第331号(2000)
- 2) 徳永裕司ら：粧技誌, 33, 163(1999)

3.2.8 不純物

1) 1,4-ジオキサン¹⁾

(1) ヘッドスペース-ガスクロマトグラフィー/質量分析法による定量²⁾

本法はシャンプー、ボディソープ、ハンドソープなどに適用できる。

【試薬】① 1,4-ジオキサン標準原液：1,4-ジオキサン200mgを精密に量り、メタノールで溶かし20mLとする。

② 内標準原液：1,4-ジオキサン-*d*₈ 200mgを精密に量り、メタノールを加えて20mLとする³⁾。

③ 内標準溶液：内標準原液2.5mLをとり、メタノールを加えて10mLとする。

④ 1,4-ジオキサン添加内標準溶液：内標準溶液1.0mLをとり、1,4-ジオキサン標準原液をそれぞれ0, 25, 50, 100, 250および500μL加え、さらにメタノールを加えて10mLとする⁴⁾。

【装置および器具】

① ヘッドスペースサンプラー：バイアルからヘッドスペースガスの一定量を自動的にガスクロマトグラフに導入できるもの⁵⁾

② ガスクロマトグラフ/質量分析計：スキャン法または選択イオン検出(SIM)が可能なもの

【試験操作】試料約1gをバイアルに精密に量り、各濃度の1,4-ジオキサン添加内標準溶液を20μLずつ加え⁶⁾、ただちにセプタムとアルミキャップをバイアルの上に置き、クリンパーで密栓する。各1,4-ジオキサン添加量につき3本ずつバイアルを用意する。バイアルは80℃で20分間加熱し、ヘッドスペースガスの一定量⁷⁾を下記条件のヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析計に注入する⁸⁾。

ガスクロマトグラフィー/質量分析の条件

カラム：6%cyanopropylphenyl—94% methylpolysiloxane(0.25mm i.d.×60m, 膜厚1.40μm)⁹⁾

カラム温度：40℃(1min), 40~240℃(8℃/min, 昇温), 240℃(3min)

注入口温度：200℃

キャリアーガス：He, 1.5mL/min¹⁰⁾

注入方式：スプリットまたはスプリットレス¹¹⁾

イオン化法：電子イオン化法(EI)

イオン化電圧：70eV

イオン源温度：200℃

検出法：スキャン法(*m/z* 40~300)/選択イオン検出法(SIM)¹²⁾

モニターイオン：1,4-ジオキサン *m/z* 88

1,4-ジオキサン-*d*₈ *m/z* 96

定性：ヘッドスペースガスの一定量について、ガスクロマトグラフィー/質量分析を行い、それぞれのピークの保持時間と質量スペクトルを1,4-ジオキサンおよび1,4-ジオキサン-*d*₈のそれらと比較して定性を行う。

定量：ヘッドスペースガスの一定量について、ガスクロマトグラフィー/質量分析を行い、それぞれのモニターイオンにおける1,4-ジオキサンと内標準物質のピーク面積比を求める。バイアルに添加した1,4-ジオキサン量を試料採取量で除したものを1,4-ジオキサン濃度(μg/g)として横軸に、1,4-ジオキサンと内標準物質とのピーク面積比を縦軸にして、プロットする。これらのプロットから近似式を作成し、得られた回帰式のY値が0を示すときのX値を、試料中の1,4-ジオキサン濃度(μg/g)として算出する。

【注解】

1) 1,4-ジオキサンは、シャンプーや皮膚洗剤剤に使用されているポリオキシエチレン系界面活性剤の製造過程の副生成物等として生成し、これら界面活性剤原料あるいは製品に不純物として残留する可能性がある。1,4-ジオキサンの健康影響としては、国際がん研究機関(IARC)が「ヒトに対する発がん性の可能性あり(possible human carcinogen)(グループ2B)」としている。

2) 個々の製品試料は配合成分の種類および量が異なり複雑なマトリックスとなっていることから、揮発性物質の1,4-ジオキサンは前処理の必要のないヘッドスペース-ガスクロマトグラフ/質量分析計を用い、製品試料のマトリックスの影響を受けないよう、内標準法と標準添加法を組み合わせる方法を採用した(文献1)。1,4-ジオキサンの試験法としては4.1.1.3(68)1,4-ジオキサン(p.850)に、水中の1,4-ジオキサンを固相抽出しガスクロマトグラフィー/質量分析法により定量する方法がある。

3) 内標準物質としてフルオロベンゼンも使用できる。フルオロベンゼンは、1,4-ジオキサン-*d*₈に比べて試料のマトリックス、装置および試験条件の違いによりピーク面積の変化が大きいので、試験しようとする試料についてフルオロベンゼンの内標準物質としての妥当性を評価する。

4) 試料中の1,4-ジオキサンの含有量が10μg/g以下を想定した1,4-ジオキサン標準原液の添加量である。試料中の1,4-ジオキサンの含有量が10μg/gを超える場合は、1,4-ジオキサ

ン標準原液を250, 500, 1000, 2500 および 5000 μL と増量して調製したものをを用いる。このとき1,4-ジオキサン標準原液はマイクロピペットおよびホールピペットを用いて添加する。なお装置や試験操作条件によって検出感度は異なるので、適切な検量線が作成できるよう、内標準溶液の濃度および1,4-ジオキサンの添加量を決める。

5) 本法は、加圧下バイアルから気相の一定量をサンプルループに導入してガスクロマトグラフに注入する装置、サンプリングニードルでバイアルを加圧し、一定量を直接ガスクロマトグラフに導入する装置など種々のヘッドスペースガス自動注入装置を用いることとしている。

6) 各濃度の1,4-ジオキサン添加内標準溶液を20 μL ずつバイアルに加えたとき、1,4-ジオキサン添加量は0, 0.5, 1, 2, 5 および 10 μg である。

7) ヘッドスペースサンプラーやガスクロマトグラフの条件によって異なるが、0.1~1 mL 程度のガスが導入されるように調整する。

8) ガスクロマトグラフへのヘッドスペースガスの導入方式は装置によって異なるので、使用する装置で最適な条件を決定する。たとえば TurboMatrix HS-40 (Perkin Elmer 社) を用いる場合、以下の条件を設定することができる。注入時間 0.1 min, 加圧時間 1 min, 引き抜き時間 0.5 min, ニードル温度 110 $^{\circ}\text{C}$, ヘッドスペースキャリアーガス圧力 190 kPa, トランスファーライン温度 200 $^{\circ}\text{C}$ 。また Agilent Technologies 社製の装置を用いる場合は以下の条件を設定する。注入時間 0.1~0.5 min, 加圧時間 0.2 min, 引き抜き時間 0.2 min, バイアル加圧 70~80 kPa, 圧力平衡時間 1 min, ループ/バルブ温度 110 $^{\circ}\text{C}$, ループ平衡化時間 0.05 min, トランスファーライン温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 振とう条件 低速かくはん

9) カラムとしては、InertCap 624 (ジーエルサイエンス) や DB-624 (Agilent Technologies 社) などがある。カラムの長さが 30 m のものでも分析可能であるが、1,4-ジオキサンと1,4-ジオキサン- d_8 のピークが分離するよう適切なカラムを選択するか他の操作条件を最適化する。

10) 線速度を約 30 cm/sec になるようにすること。カラム長によって異なる可能性があるが、おおよそのガス流量は 0.75~1.5 mL/min である。

11) 装置の感度や試料中の1,4-ジオキサン濃度によって、スプリットまたはスプリットレス方式を選択し、スプリット比は 1:10~1:200 で調整する。

12) SIM 法で保持時間を参考に1,4-ジオキサンおよび1,4-ジオキサン- d_8 それぞれのイオンピークをモニターすると高感度に定量できる。スキャンと SIM の高速切り替え機能により、スペクトルも採取しながら、スキャンより高感度な SIM のクロマトグラムが得られる装置もある。スキャン法で得られるマススペクトルによって目的物質を見逃してしまうことがなくなり、スキャン法で感度が不足する成分は SIM で高感度に測定することができる。

文献

1) Tahara, M. *et al.*: *Int. J. Cosmet. Sci.*, 35, 575 (2013)

2) 鉛¹⁾

(1) ICP/質量分析法による定量

本法は化粧品全般に適用できる。

【試薬】① 鉛標準溶液：市販の ICP 分析用または原

子吸光分析用の鉛標準原液 (100~1000 mg/L) または多元素混合標準原液²⁾を適宜希釈する³⁾。

② HNO_3 ：比重 1.37~1.42, 濃度 60~71%, 微量の金属分析に適切であることが確認されているもの⁴⁾

③ フッ化水素酸：微量の金属分析に適切であることが確認されているもの

④ メンブランフィルター：0.45 μm 以下⁵⁾

⑤ アルゴンガス：純度 99.99% (v/v) 以上

【装置および器具】① マイクロ波分解装置

② ICP/質量分析装置： \square 1.1.8 ICP/質量分析法 [装置] ① (p.48) に同じ

【試験溶液の調製】試料 0.2~0.5 g を精密に量り、フッ素樹脂製の密閉容器に入れ、 HNO_3 7 mL およびフッ化水素酸 2 mL を加える⁶⁾。次にマイクロ波を照射して 25 分間で 200 $^{\circ}\text{C}$ まで上昇させ、そのまま 30 分間保持して分解する⁷⁾。分解終了後⁸⁾、密閉容器を冷却し、容器内の分解溶液を別の容器⁹⁾に移す。密封容器内部を水で数回洗い、洗液も容器に合わせ、さらに、水を加えて 20 mL に定容する。メンブランフィルターを用いてろ過し、検量線の範囲に入るように、さらに、水で希釈したものを試験溶液とする¹⁰⁾。

【試験操作】試験溶液について、 \square 1.1.8 ICP/質量分析法 (p.48) に従って、質量数 208 のイオンカウント数を測定し、別に標準溶液 (0.1~100 ng/mL) を用いて作成した検量線から試料の濃度 ($\mu\text{g/g}$) を求める¹¹⁾。

【注解】

1) 鉛は多くはないが地殻に広く存在し、人は日常の生活において一定量の鉛を摂取している。化粧品基準では、鉛を化粧品原料あるいは製品に故意に加えることは禁止されているが、環境に普遍的に存在するため、原料中および製品製造段階での鉛の混入を完全に抑えることは困難とされている。日本では個別の医薬部外品原料に対し、酸性下 Na_2S 溶液によって生じる金属硫化物が呈色する鉛や銅などの重金属の総量を限度規制しているが、国際的には最終製品に対して、重金属ごとに規制するようになっている。本試験法は、原料および化粧品製品中の微量不純物である鉛を定量する方法である。

2) 国家計量標準にトレーサブルな標準原液またはこれと同等のものを用いる。

3) 水、0.1~1% HNO_3 または 0.3~1 mol/L HNO_3 で希釈する。試料溶液と標準溶液で同一の HNO_3 濃度となるのが望ましいが、分析法により適切な濃度の HNO_3 を用いる。

4) 有害金属分析用、超微量分析用など高純度規格のものを用いる。測定対象元素の含有量が 0.1 ng/mL 以下のもの、あるいは測定対象元素の汚染のないことを確認して用いる。

5) マイレスク LG (メルクミリポア), GD/X シリンジフィルター (GEヘルスケアジャパン) などを用いることができる。

6) 米国 FDA が口紅中の鉛の分析に用いた分解用酸混液である。金属酸化物などの無機物が多い場合、 HNO_3 にフッ化水素酸を追加、あるいは過酸化水素や HCl などとの混酸を使用すると溶解性が良くなり、鉛の定量値が上昇する。フッ化水素酸の取扱いや処理には十分注意すること。安全管理規則上フッ化水素酸が使用できない場合、 HNO_3 だけで分解してもよいが、酸化チタンなど HNO_3 には容易に溶けない金属酸化物あるいはそれを多量に含有する製品については鉛の定量値が低く表れることがある (文献 1)。

7) 本文に示したマイクロ波分解条件は一例であり、すべての製剤に適用可能な灰化法はないので、試料の種類と量、分解装置の性能や分解条件に応じて、分解に用いる酸の種類と量、マイクロ波の出力、温度や時間などを適宜変更する。分解した溶液ができるだけ不溶物の少ない透明な液体となるような分解条件を検索する。

8) フッ化水素酸を分解に用いる場合は、分解後にホウ酸で中和操作をすると、フッ化水素酸に対応していない分析装置でも分析できる。分解時間が長時間になるが、フッ化水素酸と反応して生じる不溶物が少なくなり、定量値が向上する。装置のチャンパーやトーチなどの石英や硬質ガラス製品の保護のため、分解した溶液をホットプレートなどで乾固する直前まで蒸発し、フッ化水素酸を揮発する方法も有効である。

9) ポリプロピレン、ポリエチレンおよびフッ素樹脂（ポリテトラフルオロエチレン、PTFE）製などの測定対象元素の汚染、溶出、吸着のないものを用いることが望ましい。容量が規定できる DigiTUBE (SCP SCIENCE 社) などがある。

10) 試料中の濃度に応じて希釈倍率を調整する。市販製品中の実態濃度から 5~10 倍希釈が適切である。

11) 絶対検量線法による定量を示した。試験溶液の調製および検量線の作成と分析値の算出に当たって、適切な内標準元素を用いて内標準法による定量も可能である。ただし、添加回収試験を実施するなど、分解法を含めた試験操作の妥当性を評価しておく必要がある。

文献

- 1) Hepp, N.M. *et al.* : J. Cosmet. Sci., 60, 405 (2009)

3) ベルガブテン¹⁾

(1) 高速液体クロマトグラフィーによる定性および定量
香水、オーデオロンなどの芳香化粧品中のベルガブテンに適用できる。

【試薬】① ベルガブテン標準溶液：ベルガブテン²⁾ 100 mg をメタノールに溶かし 100 mL とする。

② フロリジルカラム³⁾：フロリジルは 60~100 mesh のものを 130℃、5 時間乾燥して用いる。フロリジル 1 g をジエチルエーテル・石油エーテル (7:3) に懸濁させ、クロマト管に充てんし、無水硫酸ナトリウム 1 g を積層する。

【装置】① 高速液体クロマトグラフ：フォトダイオードアレイ検出器付き

【試験溶液の調製】試料約 0.4 g を精密に量り、100 mL の分液ロートにとり水 30 mL、塩化ナトリウム 5 g、ジエチルエーテル 30 mL を加えて、10 分間振とうしジエチルエーテル層を分取する。水層はさらにジエチルエーテル 20 mL で抽出する。ジエチルエーテル層を合わせ、無水硫酸ナトリウム 10 g で乾燥し、ロータリーエバポレーターで約 1 mL に濃縮する。濃縮液をジエチルエーテル・石油エーテル (7:3) を用いてフロリジルカラムに負荷し、ジエチルエーテル・石油エーテル (7:3) 20 mL を流す。次いでジエチルエーテル・アセトン (1:1) 10 mL で溶出し、溶出液はロータリーエバポレーターで約 1 mL に濃縮し、アセトニトリル・メタノール・水 (1:1:2) を加えて 2 mL とする。

【試験操作】

高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム：ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm)⁴⁾

カラム温度：40℃

移動相：アセトニトリル・メタノール・水 (1:1:2)

流速：1.0 mL/min

検出器：フォトダイオードアレイ検出器 (200~350nm)

定性：標準溶液をアセトニトリル・メタノール・水 (1:1:2) を用いて 1000 倍に希釈する。この溶液 50 μL をとり、高速液体クロマトグラフィーを行い、得られたクロマトグラムから保持時間および UV スペクトルを測定する。試験溶液 50 μL についても同様に操作して保持時間における UV スペクトルを求め、標準溶液のそれと比較して定性を行う。

定量：試験溶液 50 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、268 nm でのクロマトグラムのピーク高さまたはピーク面積を測定し、別に作成した検量線から試験溶液中のベルガブテンの濃度 A (μg/mL) を求め、次式により試料 100 g 中の含有量を算出する。

検量線の作成：標準溶液をアセトニトリル・メタノール・水 (1:1:2) で希釈し、1 mL 当たり 0.5、1.0 および 1.5 μg を含む標準系列をつくり、各 50 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたそれぞれのピーク高さまたはピーク面積と濃度から検量線を作成する。

計算：

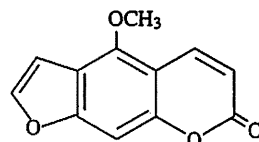
試料 100 g 中のベルガブテンの含有量 (g)

$$= \frac{A \times 2}{\text{試料採取量 (g)}} \times \frac{1}{10^6} \times 100$$

【注解】

1) 天然フロクマリンであるベルガブテン (5-メトキシソラレン) は化粧品による光毒性反応の原因物質の一つであり、種々の精油中にみられる。特に *Citrus bergamia Risso et Poit.* の果皮を圧搾して抽出され、清涼感のある香料として化粧品に広く用いられるベルガモット油には、その成分としてベルガブテンが 0.2~0.5% 含有される。

ベルガモット油が皮膚を日光に対して過敏にすること、およびベルガモット油の成分のベルガブテンがベルロック皮膚炎の原因であることが実証されている。



2) 5-Methoxypsoralen (Sigma-Aldrich 社) を用いる。

3) Sep-Pak Vac Florisil Cartridge 1 g/6 mL (Waters 社) を用いてもよい。この場合、カートリッジにジエチルエーテル・石油エーテル (7:3) 20 mL を流し、無水 Na₂SO₄ 1 g を積層して用いる。

4) カラムとして TSKgel ODS-80 Ts (東ソー) を用いた場合、ベルガブテンの保持時間は約 8.1 分である。

4) ベンゾ[α]ピレン¹⁾²⁾

(1) ガスクロマトグラフィー/質量分析法による定性および定量

本法はカーボンブラックに残存するベンゾ[α]ピレン³⁾に適用する。

【試薬】① ジクロロメタン：残留農薬試験用を用いる。

② ベンゾ[α]ピレン標準溶液：ベンゾ[α]ピレン 10 mg を精密に量り、ジクロロメタンを加えて溶かし、正確に 100 mL とする。

【器具および装置】① ソックスレー抽出器

② ソックスレー抽出用円筒ろ紙

③ シリカゲルミニカラム：シリカゲル 1 g を充てんしたもの⁴⁾

④ ガスクロマトグラフ/質量分析計

【試験溶液の調製】試料 10~20 g を精密に量り、ソックスレー抽出用円筒ろ紙に入れ、試料上に脱脂綿を少量のせる。トルエン 250 mL をソックスレー抽出器の受器に入れて装置を組み、1 時間当たりほぼ 4 サイクルの割合になるようにして 48 時間抽出する。放冷後、器具を少量のトルエンで洗い、抽出液に合わせる。抽出液をろ過したのち、ナス型フラスコに移しロータリーエバポレーターを用いて液が約 2 mL になるまで濃縮する。得られた濃縮液をあらかじめトルエン 10 mL でコンディショニングしたシリカゲルミニカラムに入れ、ナス型フラスコをトルエン 2 mL で洗い、この洗液もシリカゲルミニカラムに入れる。上層の液がほとんどなくなるまで流下したのち、トルエン 10 mL を流下する。溶出液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固する。残留物にジクロロメタンを正確に 1 mL 加えて溶解し、試験溶液とする⁵⁾。

【試験操作】

ガスクロマトグラフィー/質量分析の条件

カラム：キャピラリーカラム、液相 5% diphenylpolysiloxane + 95% dimethylpolysiloxane (0.25 mm i.d. × 30 m, 膜厚 0.25 μ m)⁶⁾

カラム温度：60℃ (2.0 min), 60~300℃ (25℃/min, 昇温), 300℃ (6 min)

注入口温度：280℃

キャリアーガスおよび流量：He, 2 mL/min⁷⁾

イオン源温度：230℃

イオン化電圧：70 eV

検出器：選択イオン検出器 (SIM)

定量用フラグメントイオン： m/z 252

定性：標準溶液をジクロロメタンを用いて 10000 倍に希釈する。この液 2 μ L をとり、ガスクロマトグラフィー/質量分析を行い、得られたクロマトグラムから保持時間およびフラグメントイオンを測定する。試料溶液 2 μ L についても同様に操作して保持時間およびフラグメントイオン⁸⁾を測定し、標準溶液のそれらと比較して定性を行う。

定量：試験溶液 2 μ L を用いてガスクロマトグラフィー/質量分析を行い、得られた定量用フラグメントイオン⁹⁾のピーク面積を測定し、別に作成した検量線から試験溶液中のベンゾ[α]ピレンの濃度 A (ng/mL) を求め、次式に

より試料 1 g 中の含有量を算出する。

$$\begin{aligned} & \text{試料 1 g 中のベンゾ [}\alpha\text{] ピレンの含有量 (ng)} \\ & = A / \text{採取した試料量 (g)} \end{aligned}$$

検量線の作成：標準溶液をジクロロメタンで希釈し、1 mL 当たり 1~50 ng を含む標準系列を作成する¹⁰⁾。各 2 μ L について試験溶液と同様にガスクロマトグラフィー/質量分析を行い、定量用フラグメントイオンのピーク面積より検量線を作成する。

【注解】

1) カーボンブラックは微粉末状の炭素粒で、炭化水素 (天然ガス、石炭ガス、石油など) の不完全燃焼あるいは熱分解によって製造するため、ベンゾ[α]ピレンをはじめとする多環芳香族炭化水素を含有していることが知られている。その化粧品用途としては、着色剤として白髪染、眉墨、アイライナー、マスカラなどに使用されている。化粧品原料として用いられているものはチャンネルブラック (Channel Black) とファーネスブラック (Furnace Black) の 2 種類である。

2) カーボンブラックは非常に強い吸着性を有するため、ベンゾ[α]ピレンの抽出は極めて困難である。また、原料、製造方法、製造条件のもたらす吸着能の相違により抽出率の変動も大きく、ベンゾ[α]ピレンを添加しても全く回収不能の場合もみられる。したがって、本法のほか、真空昇華法、溶媒抽出法、加温超音波抽出法など種々検討されているが、いずれの方法も抽出効率の点で十分満足できる方法は見当たらない。これらのうちでは本法の回収率が最も高いと認められたので採用することとした (文献 1)。

3) □2.4.2.4 7) 【注解】(p. 537) 参照

4) この種のカラムとしては、Sep-Pak Vac Silica Cartridges (Waters 社)、Supelclean LC-Si (Sigma-Aldrich 社) などが市販されている。

5) 不溶物があるときにはメンブランフィルター (孔径 0.45 μ m) でろ過する。

6) これに相当するカラムとしては、InertCap 5 MS (ジーエルサイエンス)、DB-5 (Agilent Technologies 社)、PTE-5 (Sigma-Aldrich 社) などが市販されている。

7) ベンゾ[α]ピレンの保持時間は約 13 分である。

8) ベンゾ[α]ピレンの特徴的なフラグメントイオンは、 m/z 113, 126 および 252 である。

9) 定量用フラグメントイオンは、 m/z 252 である。

10) 1~50 ng/mL の範囲のベンゾ[α]ピレン標準系列が適当であるが、定量限界と感度に応じて濃度を設定する。本法によるベンゾ[α]ピレンの検出限界は約 0.5 ng/mL であり、定量限界は約 1.0 ng/mL である。

文 献

1) 徳永裕司ら：日本化粧品学会誌, 32, 175 (2008)

5) ホルムアルデヒド¹⁾(1) アセチルアセトン法による定量²⁾

本法は化粧水、クリーム、乳液、シャンプーおよびリンスに適用できる。

【試薬】① ホルムアルデヒド標準溶液³⁾：□2.4.2.4

1) (1) 【試薬】③ (p. 500) に従う。ただし、標準溶液のホルムアルデヒドの濃度は 1~4 μ g/mL の必要濃度とする

(用時調製)。また試験溶液の調製第2法を使用する場合は水で希釈するかわりに30%エタノール溶液で希釈する。

② アセチルアセトン溶液：☞3.1.1.3 13) (1)〔試薬〕
② (p.646)に同じ

③ 酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム150gを水に溶かし、これに酢酸3mLおよび水を加えて1000mLとする。

【試験溶液の調製】① 第1法⁴⁾：試料約1gを精密に量り、25%硫酸ナトリウム溶液⁵⁾20mLを加えてかき混ぜたのち、水を加えて50mLとする。40℃の水浴中にときどき振り混ぜながら1時間放置したのち、水冷し室温に戻す。液が透明な場合はそのまま、混濁または不溶物がある場合は、1800×g(約3500rpm)で10分間遠心、またはガラスフィルター(No.2)でろ過し、上清または、ろ液を試験溶液とする⁶⁾。

② 第2法⁷⁾：試料約1gを精密に量り、水25mLおよびエタノール15mLを加えてかき混ぜたのち、50mLのメスフラスコに移す。密栓して40℃の水浴中にときどき振り混ぜながら1時間放置したのち、水冷して室温に戻し、水を加えて50mLとする。液が透明な場合はそのまま、混濁または不溶物がある場合はガラスフィルター(No.2)でろ過し、ろ液を試験溶液とする⁶⁾。

【試験操作】試験溶液5mLをとり、アセチルアセトン溶液5mLを加えて振り混ぜ、40℃の水浴中で30分間加温し、30分間放冷する⁸⁾。この液を、試験溶液5mLに酢酸アンモニウム溶液5mLを加えて同様に操作した液を対照として層長10mmで414nmにおける吸光度を測定し、Aとする。別に標準溶液および水5mLずつをとり、それぞれ同様に操作した液について水を対照として吸光度を測定し、AsおよびA0とする。試料中のホルムアルデヒドの含有量(μg/g)は次式によって算出する。

計算：

試料中のホルムアルデヒドの含有量(μg/g)

$$= K \times \frac{A - A_0}{A_s - A_0} \times 50 \times \frac{1}{\text{試料採取量 (g)}}$$

K：ホルムアルデヒド標準溶液の濃度(μg/mL)

【注解】

1) 化粧品のホルムアルデヒドの法的規制に関して、化粧品では化粧品基準(文献1)で、また医薬部外品では、昭和37年9月6日付薬発第464号通知「医薬部外品等の取り扱いについて」で、ホルマリンが規制の対象となっている。

2) 化粧品のホルムアルデヒドの試験では、原料の分解などによるホルムアルデヒドの生成などが従来より問題であった

(文献2, 3)。たとえば、酸化エチレン鎖を持つ界面活性剤などの熱分解の問題、エチレンオキシド付加物系界面活性剤などの試験時の温度による呈色度の上昇の問題などがある。本試験法は、これら前処理法における問題、試験操作時の温度の問題などを考慮して、化粧品中に遊離して存在するホルムアルデヒドの試験を目的として試験条件が設定された。

このほか、トルエンスルホンアミド樹脂の問題がある。トルエンスルホンアミド樹脂、または、重合前の混合製剤に多量の水を加えて放置または加温するとき、加水分解されホルムアルデヒドを遊離する性質がある。

次に、欧米では配合例のある防腐殺菌剤のたぐいで、直接ホルマリンが配合されたものではないが、分解してホルムアルデヒドを遊離する、ホルムアルデヒドドナー型防腐剤の問題がある。これに本試験法を適用するとき、本試験法の緩和な条件でも加水分解を受け、ホルムアルデヒドの検出が認められるものがある。したがって、輸入化粧品等を対象として試験を行うときは、この点にも配慮を要する。

3) ホルマリンをそのつどヨウ素滴定法で標定し、水で希釈してホルムアルデヒドとして1~4μg/mLの標準溶液を調製する。

4) 試験溶液の調製第1法は、リンス、乳液およびクリームなどに適する。第1法で試験溶液が混濁する場合は、調製第2法を適用するとよい。

5) 25% Na₂SO₄はほぼ飽和溶液であり、多少結晶が析出することもある。クリームなど水に分散しにくい試料では、約5分間振とうする。また起泡性のある試料では静かに混和して、強く振とうせず、ただちに水を加えて50mLとする。

6) 試験溶液中のホルムアルデヒド濃度が4μg/mL以上の高濃度のときは、試料の採取量の増減または試験溶液の希釈を行う。

7) 第2法はシャンプー、液体石けんなどに適する。

8) ホルマリンから調製した標準溶液について、温度および加温時間を変動させて検討した結果、呈色の強度は試験法の条件ではほぼ平衡に達することが確認されている。

文献

- 1) 厚生省告示平成12年9月29日第331号(2000)
- 2) 舘 照雄：化粧品分析・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No.5、フレグランスジャーナル社、p.210(1984)
- 3) 岡谷吉雄：最新化粧品分析法、木嶋敬二編、フレグランスジャーナル社、p.831(1995)

(2) アセチルアセトンポストカラム誘導体化検出法を用いる高速液体クロマトグラフィーによる定性および定量¹⁾

本法は化粧水、クリーム、乳液、シャンプーおよびリンスに適用できる。

【試薬】①ホルムアルデヒド標準溶液：☞2.4.2.4 1)

(1)〔試薬〕③(p.500)に準じて調製する。

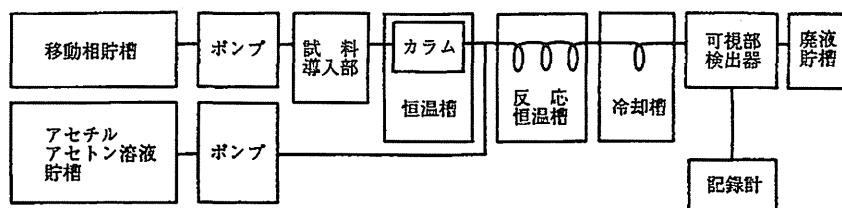


図1 ポストカラム誘導体化反応HPLC装置の一例

- ② アセチルアセトン溶液：☞3.1.1.3 13) (1) [試薬]
② (p. 646) に同じ

〔装置〕① 高速液体クロマトグラフ：UV 検出器付き

② ポストカラム誘導体化 HPLC 反応装置：図 I に示すように通常の HPLC 装置の溶出液にアセチルアセトン溶液をポンプで送液添加し、接続された反応恒温槽（使用するステンレスチューブは 0.5 mm i.d.×5 m を用いる）、冷却槽（使用するステンレスチューブは 0.5 mm i.d.×1 m を用いる、水冷）を通過したのち、UV 検出器に導かれるようなポストカラム誘導体化反応装置を用いる。

〔試験溶液の調製〕① 第 1 法：試料 1~2 g を精密に量り、水を加えてかき混ぜながら 100 mL のメスフラスコに移し、さらに水を加えて 100 mL とする。混濁または不溶物がある場合は、1800×g（約 3500 rpm）で 10 分間遠心、またはメンブランフィルター（0.45 μm）を用いてろ過を行い、上清またはろ液を試験溶液とする²⁾。

② 第 2 法³⁾：試料 1~2 g を精密に量り、テトラヒドロフラン 50 mL を加えて溶解し、水を加えて 100 mL とする。混濁または、不溶物がある場合は、1800×g で 10 分間遠心、または、メンブランフィルター（0.45 μm）を用いてろ過を行い、上清またはろ液を試験溶液とする²⁾。

〔試験操作〕

高速液体クロマトグラフィーの条件

カラム：ODS（4.6 mm i.d.×150 mm または 250 mm）

カラム温度：室温または水浴中

移動相：6 mmol/L Na₂HPO₄（pH=2.1）

流速：1.0 mL/min⁴⁾

検出器：UV 検出器（414 nm）

アセチルアセトン溶液流速：0.5 mL/min

反応槽温度：90℃

定性：4 μg/mL の濃度に調製した標準溶液および試験溶液各 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたクロマトグラムから保持時間を求め定性を行う。

定量：試験溶液 10 μL を高速液体クロマトグラフに注

入し、得られたクロマトグラムのピーク高さ（またはピーク面積）を測定し、別に作成した検量線から、試験溶液中のホルムアルデヒド濃度（μg/mL）を求め、次式により試料中のホルムアルデヒド濃度 A（μg/g）を算出する。

検量線の作成：ホルムアルデヒド標準溶液を水で希釈し、1, 2, 4, 6 および 10 μg/mL 濃度の標準系列をつくり、各 10 μL を高速液体クロマトグラフに注入し、得られたそれぞれのピーク高さ（またはピーク面積）と濃度から検量線を作成する。ただし、第 2 法で調製する場合ホルムアルデヒド標準溶液は水のかわりに、テトラヒドロフラン・水（80：20）を用いて希釈する。

計算：

$$\begin{aligned} & \text{試料中のホルムアルデヒドの含有量 } (\mu\text{g/g}) \\ & = \frac{A \times 100}{\text{試料採取量 } (\text{g})} \end{aligned}$$

〔注解〕

1) アセチルアセトンポストカラム誘導体化検出法を用いる HPLC 法（文献 1, 2）はアセチルアセトンを用いる比色定量法を補完するために取載された。アセチルアセトン法で試験溶液の混濁が強く測定が困難であったり、試験溶液の調製時や試験操作時の加温条件で加水分解され遊離のホルムアルデヒドが検出できないなど、試験に障害がみられるときに適用するとよい。本法は、ホルムアルデヒドドナー型防腐剤を配合する化粧品中のホルムアルデヒドを分析するのに適する（文献 1, 2）。

2) 試験溶液のホルムアルデヒドの濃度が 10 μg/mL 以上の高濃度のときは、試料の採取量の増減または試験溶液の希釈を行う。

3) 試験溶液の調製第 2 法は、水に不溶性の油性物質の多い製品に適用する。

4) カラムに TSKgel ODS-80 Tm（4.6 mm i.d.×150 mm、東ソー）を用いた場合、中性クリーム中における本測定条件での保持時間は約 3.8 分である。

文 献

- 1) 岡谷吉雄：最新化粧品分析法，木嶋敬二編，フレグランスジャーナル社，p. 831（1995）
- 2) Kijima, K. *et al.* : Analytical Sciences, 7 supp., 913（1991）

