

逆相クロマトグラフィーによる薬用石けん中の有効成分イソプロピルメチルフェノールの分析

岩田 奈津紀

ユーザーベネフィット

- ◆ 逆相クロマトグラフィーでイソプロピルメチルフェノール (IPMP) とブチルパラベンを分離可能 (分離度2以上)
- ◆ 厚生労働省より制限されているIPMPの配合量 (0.1~0.5%) については、蛍光検出も紫外可視吸光度検出も可能
- ◆ 高速化により、分析時間を約50%、移動相消費量を約40%に削減可能

■はじめに

2015年、欧州化学機関 (ECHA) がトリクロサンを含有する抗菌石けんを¹⁾、2017年には、米国食品医薬品局 (FDA) がトリクロサン等19成分を含有する抗菌石けんを販売停止としました²⁾。日本でも厚生労働省がこの措置に追従し、代替製品への切替を要請する旨の通知を发出了しました³⁾。そこで代替製品に採用された代表的な成分が、イソプロピルメチルフェノール (IPMP) です。

化粧品試験法を参考にすると、防腐剤としてパラオキシ安息香酸ブチル (ブチルパラベン) を含む場合、逆相クロマトグラフィー (逆相モード) ではIPMPとピークが重なる可能性があり、順相クロマトグラフィー (順相モード) の採用が好ましいとの記載があります⁴⁾。しかし、順相モードは逆相モードに比べ取扱いが容易でないことが知られています。

本稿では、Shim-pack™ GIST C18を用いることで、逆相モードでもこれらの成分を分離度2以上で分離できた事例をご紹介します。同時に、蛍光検出することでUV検出に比べ約20倍の高感度分析が可能でした。また、粒子径2 μmの高速分析用カラムを用いることにより、粒子径5 μmのカラムに比べ、分析時間を約50%、移動相消費量を約40%に抑えることができました。

■イソプロピルメチルフェノール標準溶液の分析

IPMPは殺菌作用、抗菌作用、抗酸化作用がある成分で、今や医薬部外品や化粧品など多くの製品に使用されており、薬用石けんの有効成分として使用されています。厚生労働省より配合量は0.1~0.5%と制限されており⁵⁾、分析においては蛍光検出が適しています。薬用石けんは化粧品試験法の対象外ではありますが、これを参考にすると蛍光検出条件が指定されており、IPMPの配合量が0.25%以上の濃度であれば、紫外可視吸光度 (UV) 検出器を用いることができると記載されています。

ここでは、化粧品試験法を参考にしたIPMP分析⁴⁾とその高速化を検討しました。表1、2にそれぞれの分析条件を示します。図1には、蛍光検出器 (RF-20AXS) およびフォトダイオードアレイ (PDA) 検出器 (SPD-M40) で採取したクロマトグラムを示します。いずれの図も上段には粒子径5 μmの分析カラム、Shim-pack GIST C18を用いて採取したクロマトグラムを、下段には同シリーズの高速分析用カラム (粒子径2 μm) を用いて採取したクロマトグラムを示します。高速分析用カラムを用いることにより、分析時間を約50%、移動相消費量を約40%に抑えることができました。

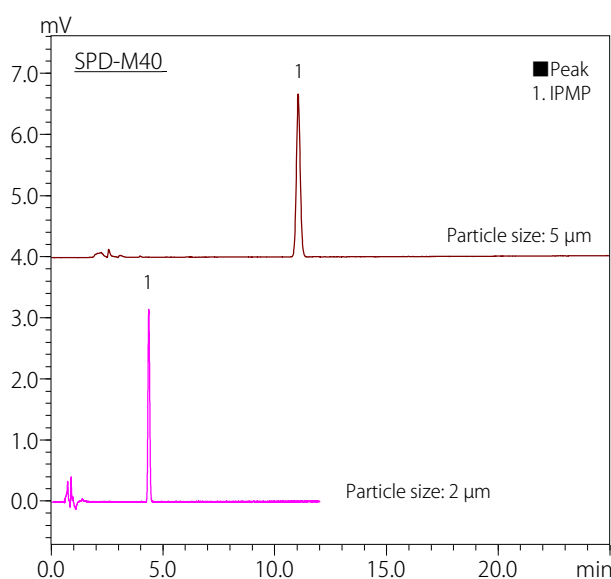
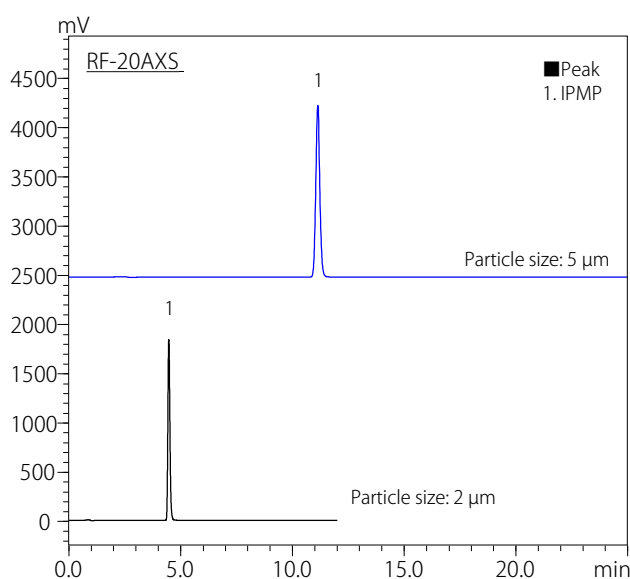


図1 IPMP標準溶液 (5 mg/L) のクロマトグラム

表1 分析条件 (粒子径5 μm)

System	: Nexera lite
Column	: Shim-pack GIST C18*1 (250 × 4.6 mm I.D., 5 μm)
Flow rate	: 1.0 mL/min
Mobile phase	: A) water B) acetonitrile B. Conc: 50%
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 10 μL
Vial	: SHIMADZU LabTotal™ for LC 1.5 mL, Glass*2
Detection (PDA)	: SPD-M40 at 278 nm
Detection (FL)	: RF-20AXS Em: 280 nm, Ex: 305 nm

*1 P/N: 227-30017-08 *2 P/N: 227-34001-01

表2 分析条件 (粒子径2 μm)

System	: Nexera XR
Column	: Shim-pack GIST C18*3 (150 × 3.0 mm I.D., 2 μm)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Mobile phase	: A) water B) acetonitrile B. Conc: 50%
Mixer	: MR 180 μL II
Column temp.	: 40 °C
Injection volume	: 4 μL
Vial	: SHIMADZU LabTotal for LC 1.5 mL, Glass
Detection (PDA)	: SPD-M40 at 278 nm
Detection (FL)	: RF-20AXS Em: 280 nm, Ex: 305 nm

*3 P/N: 227-30002-05

■ イソプロピルメチルフェノールとブチルパラベンの分離

化粧品試験法を参考にすると、防腐剤としてパラオキシ安息香酸ブチル (ブチルパラベン) を含む場合、逆相モードでは両者が分離不十分となる可能性があり、順相モードの採用が好ましいとの記載があります。しかし、順相モードはカラム平衡化に時間がかかる、ベースラインが安定しにくい等、逆相モードに比べ取扱いが容易でないことが知られています。図2にRF-20AXSによるIPMPとパラベン4成分の混合標準溶液のクロマトグラムを示します。Shim-pack GIST C18を用いることで逆相モードでもこれらの成分を分離度2以上で分離できました (表3)。

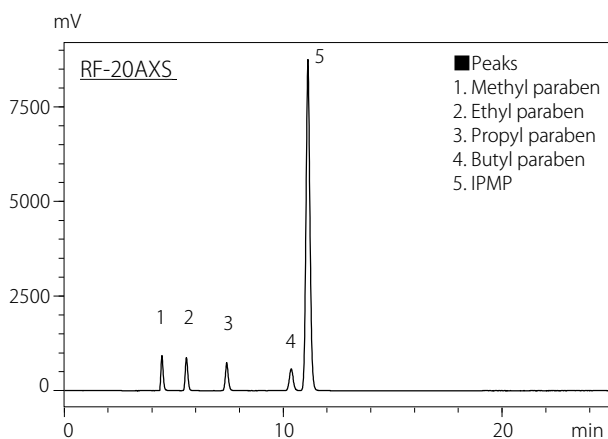


図2 IPMPとパラベン4成分混合標準溶液 (25 mg/L) のクロマトグラム

表3 IPMPとブチルパラベンの分離度

Column	Detector	Resolution
Shim-pack GIST C18 (particle size: 5 μm)	RF-20AXS	2.3
	SPD-M40	2.3
Shim-pack GIST C18 (particle size: 2 μm)	RF-20AXS	2.0
	SPD-M40	2.2

■ 検量線

図3にそれぞれの分析における0.5~10 mg/Lの検量線を示します。この濃度は、実試料中の含有量で0.025~0.5%に相当します。いずれも寄与率 $R^2=0.9999$ 以上と良好な直線性が得られました。

Shim-pack GIST C18 (粒子径5 μm) Shim-pack GIST C18 (粒子径2 μm)

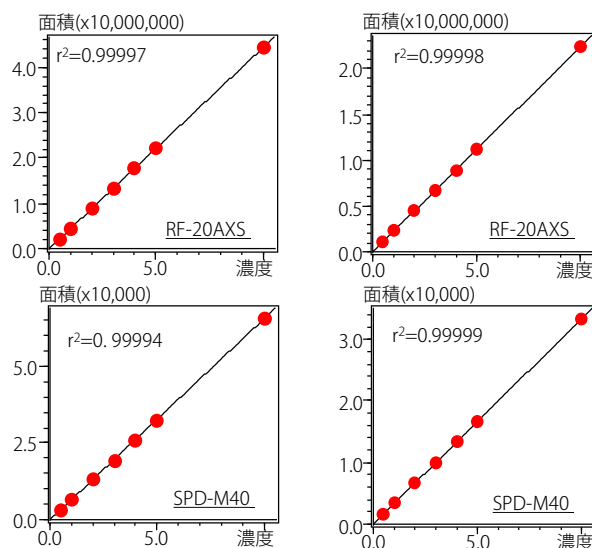


図3 検量線

■ RF-20AXSとSPD-M40の感度の比較

表4に、RF-20AXSとSPD-M40について、ASTM法で算出したIPMP (2 mg/L) のS/Nを示します。また、図4には、それらの検出器から得られたクロマトグラムの比較を示します。この濃度は、実試料中の含有量で0.1%、すなわち、許容含有量の最低濃度に相当します。RF-20AXSはSPD-M40に比べ、約20倍高感度にIPMPが検出されました。また、SPD-M40を使用した場合でも、許容含有量の最低濃度において、定量下限値を上回っていました。

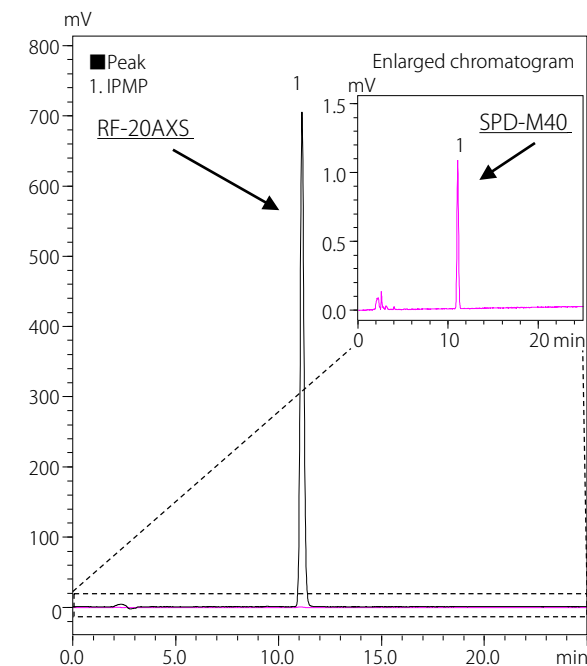


図4 IPMP標準溶液 (2 mg/L) のクロマトグラムの比較

表4 IPMP (2 mg/L) のS/Nの比較

Column	Detector	S/N*4
Shim-pack GIST C18 (particle size: 5 μm)	RF-20AXS	6289
	SPD-M40	317

*4 ASTM, Range: 15-25 min, Interval: 0.5 min

■再現性

表5に、1 mg/Lの標準溶液について、6回繰り返し分析における保持時間と面積の再現性 (%RSD) を示します。いずれの分析においても保持時間、面積ともに再現性は1%以下の結果が得られました。なお、SPD-M40に比べ、高感度に検出できたRF-20AXSの方が面積再現性は良好でした。

表5 6回繰り返し分析における再現性 (%RSD)

Column	Detector	Retention time	Area
Shim-pack GIST C18 (particle size: 5 μm)	RF-20AXS	0.04	0.13
	SPD-M40	0.04	0.79
Shim-pack GIST C18 (particle size: 2 μm)	RF-20AXS	0.12	0.17
	SPD-M40	0.13	0.49

■薬用石けん中イソプロピルメチルフェノールの分析

試料は、市販薬用石けん4種類を使用しました。前処理法は、化粧品試験法を参考にしました。図5に前処理プロトコルを示します。薬用石けんをメタノール溶媒によって抽出し、0.2 μmのメンブランフィルターでろ過後、メタノールで希釈した液をHPLCに供しました。

図6に粒子径5 μmカラムで採取したクロマトグラムを、図7には粒子径2 μmカラムカラムを用いて採取したクロマトグラムを示します。なお、ここではRF-20AXSによる結果のみを示します。いずれの分析においても、IPMPを他の成分から分離できました。また、薬用石けんCは、メチルパラベンとエチルパラベンが検出されました。

定量結果から薬用石けん中のIPMPの含有量を計算しました。表6、7に薬用石けん中のIPMPの含有量を示します。RF-20AXSでもSPD-M40でも同等の結果が得られました。また、化粧品試験法に基づいた分析と高速分析のいずれにおいても、これらの試料には0.1 g/100 g、すなわち、0.1%のIPMPが含有されていました。

表6 薬用石けん中IPMPの含有量
Shim-pack GIST C18 (粒子径5 μm)

	Concentration		Content			
	mg/L		g/100 g		%*5	
	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40
Medicated soap A	2.04	2.04	0.100	0.100	0.1	0.1
Medicated soap B	2.08	2.08	0.102	0.102	0.1	0.1
Medicated soap C	2.05	2.06	0.102	0.102	0.1	0.1
Medicated soap D	2.06	2.05	0.101	0.101	0.1	0.1

*5 Content restrictions by the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan: 0.1~0.5%

表7 薬用石けん中IPMPの含有量
Shim-pack GIST C18 (粒子径2 μm)

	Concentration		Content			
	mg/L		g/100 g		%	
	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40	RF-20AXS	SPD-M40
Medicated soap A	2.04	2.04	0.100	0.100	0.1	0.1
Medicated soap B	2.09	2.08	0.103	0.102	0.1	0.1
Medicated soap C	2.05	2.04	0.101	0.101	0.1	0.1
Medicated soap D	2.05	2.05	0.100	0.100	0.1	0.1

Weigh 1 g of medicated soap in 100 mL of volumetric flask
Add 70 mL of methanol, then sonicate
Add methanol to make 100 mL
Filtrate with 0.2 μm membrane filter (discard initial flow)
Transfer 5 mL of the sample solution in 25 mL of volumetric flask, add methanol to make 25 mL, and mix well
HPLC

図5 前処理プロトコル

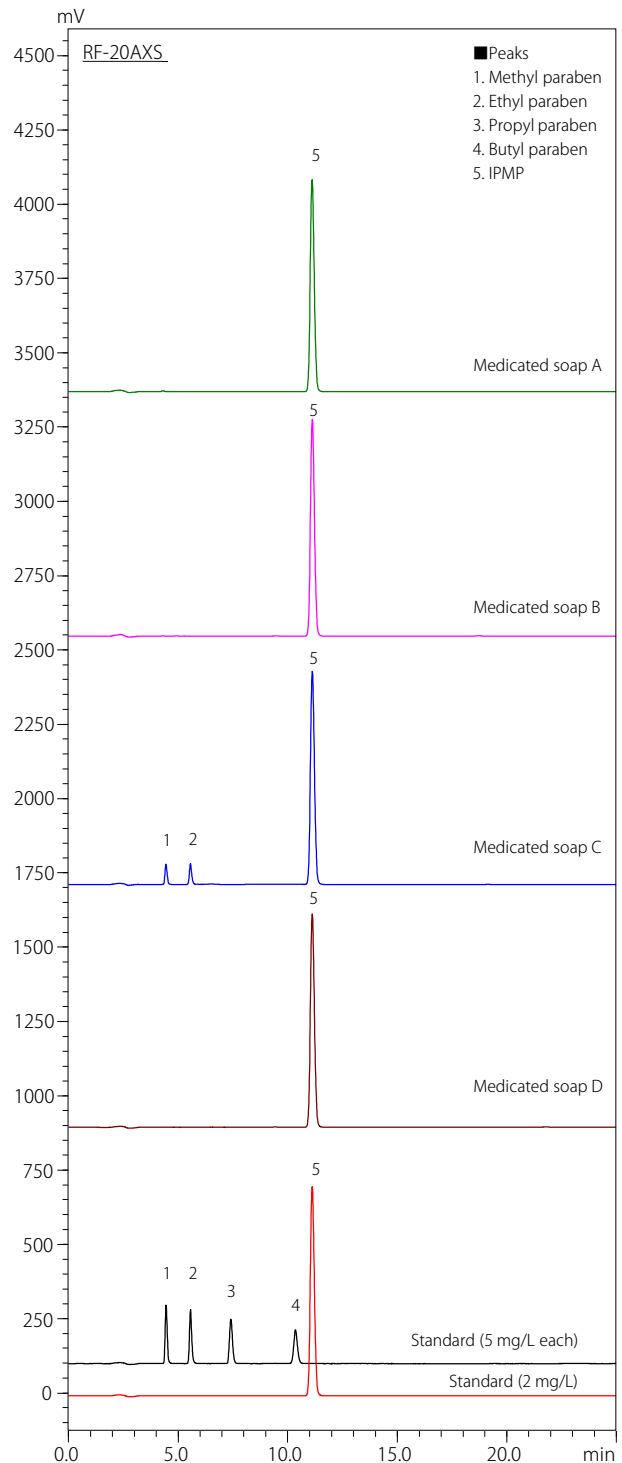


図6 薬用石けんクロマトグラム (粒子径5 μmカラム、RF-20AXS)

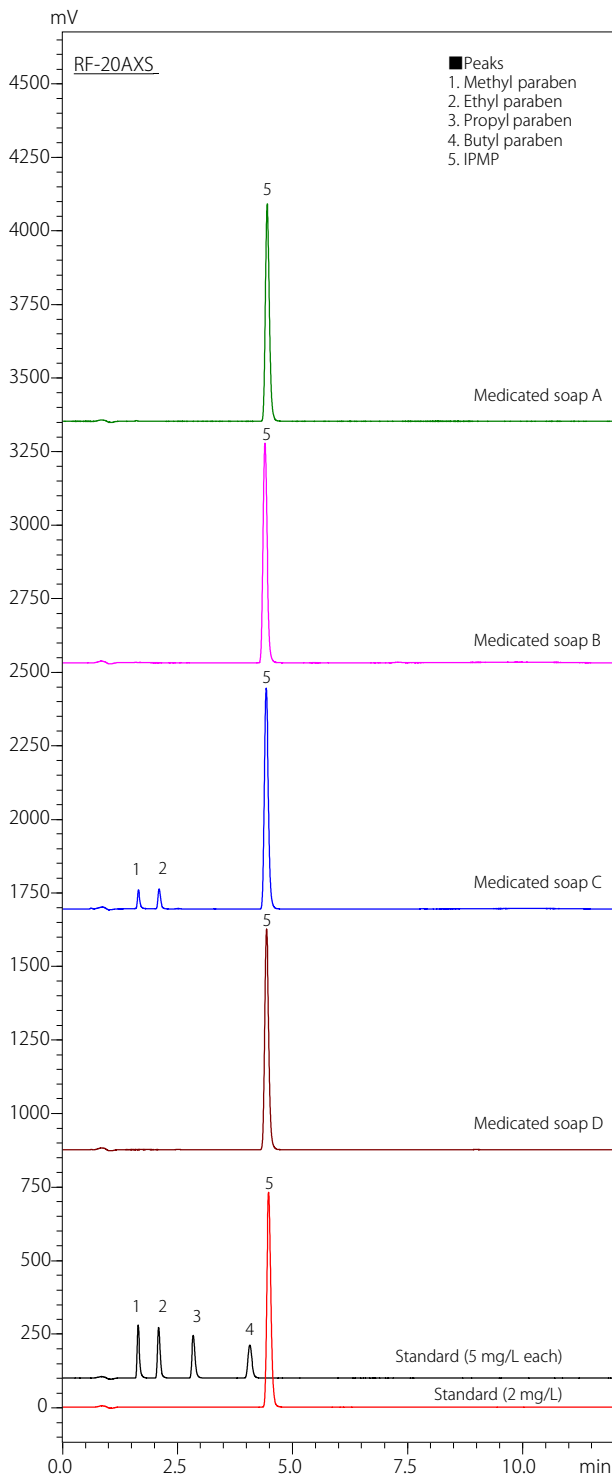


図7 薬用石けんのクロマトグラム (粒子径2 μmカラム、RF-20AXS)

■ UVスペクトルによる確認

SPD-M40などのPDA検出器を使用した場合、ピークの保持時間に加え、標準品のUVスペクトルとの一致から定性することが可能です。

図8にSPD-M40で分析した薬用石けんAと標準品のクロマトグラムを示します。

また、図8で得られた薬用石けんAに含有される約11分のUVスペクトルと標準品のUVスペクトルの重ね書きを図9に示します。各UVスペクトルは比較のため、ノーマライズして表示しています。薬用石けんAおよび標準品のいずれも279 nmに極大吸収波長が検出されたため、薬用石けんAの約11分のピークは、IPMPであると同定できました。

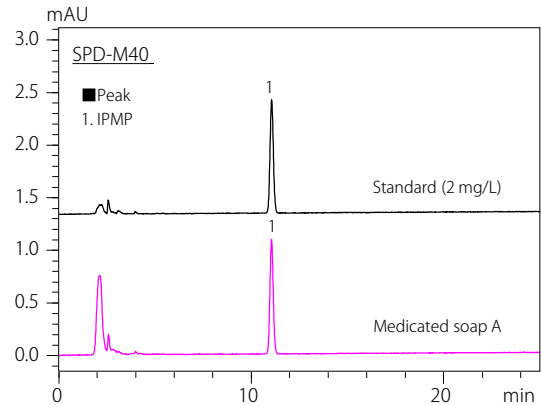


図8 薬用石けんのクロマトグラム (SPD-M40)

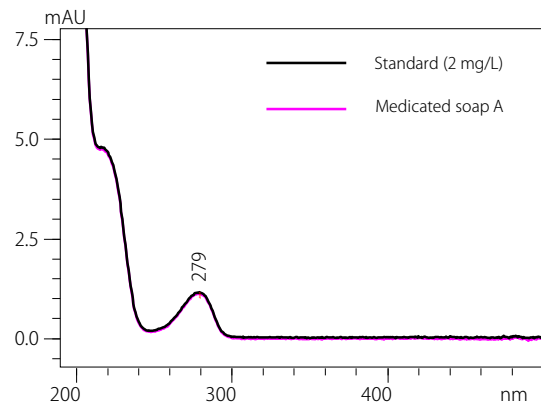


図9 UVスペクトルの比較 (SPD-M40)

■ まとめ

逆相モードによる薬用せっけん中IPMP分析について、両検出法を比較し、かつ、高速化を検討しました。今回分析した試料にはいずれもブチルパラベンが含まれていなかったため、混合標準溶液でIPMPとブチルパラベンの分離を確認したところ、Shim-pack GIST C18を用いることで分離度2以上で分離可能でした。また、UV検出に比べ、蛍光検出では、約20倍高感度に分析できました。さらに、UV検出であっても配合量の下限濃度である0.1%が定量可能であったこと、UVスペクトルからIPMPが他の成分から分離できたことも確認できました。よって、PDA検出器で定性確度を上げた分析も、蛍光検出器を用いた高感度分析も可能であった。さらに、同シリーズの高速分析用カラムを用いることにより、分離を保ったまま、分析時間および移動相消費量をそれぞれ約50%、約40%に削減できました。

<参考文献>

- 1) ECHA, Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products (2015)
- 2) FDA, FDA issues final rule on safety and effectiveness of antibacterial soaps (2016)
- 3) 厚生労働省、薬用石けんに関する取扱い等について (平成28年9月30日付薬生薬審発0930第4号及び薬生安発0930第1号)
- 4) 日本薬学会編、衛生試験法・注解2015、692-693、2015、金原出版
- 5) 厚生労働省、薬用石けんの承認審査に係る留意事項について (平成30年3月29日薬生薬審発0329第13号)

Nexera、Shim-pack、およびSHIMADZU LabTotalは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

株式会社 島津製作所 分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター

初版発行：2020年11月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2020