

ドリンク剤中の防腐剤の研究

高速液体クロマトグラフィーによる定量

中島 慶子* 宮本美紀子** 安田 敏子*

I. 緒 言

安息香酸 (BA) 及びその塩類とパラオキシ安息香酸エステル類 (パラベン類) は、医薬品の防腐剤として広く利用されている。とりわけパラベン類は、低毒性、不揮発性、安定かつ広いpH領域で防腐作用を有するなどの有用性が高く評価され、¹⁾注射剤、シロップ、点眼剤、軟膏、ゼリー、軟カプセル基剤などに配合されることが多い。

医薬品の一剤型にドリンク剤がある。これは各種ビタミン類にアミノ酸、生薬などを配合し、滋養強壯、肉体疲労時の栄養補給などを効能効果として用いられる内用液剤である。医薬品のうち特にドリンク剤については、「いわゆるドリンク剤の防腐剤等について」(昭和48年5月12日薬製第651号)という通知が出されている。表1にこの通知の内容を示した。

表1 ドリンク剤中の防腐剤配合量の規制

成 分 名	配 合 量
安息香酸	安息香酸として0.06%以下
安息香酸ナトリウム	
パラオキシ安息香酸イソブチル	パラオキシ安息香酸として0.01%以下
パラオキシ安息香酸イソプロピル	
パラオキシ安息香酸エチル	
パラオキシ安息香酸ブチル	
パラオキシ安息香酸プロピル	

パラベン類の分離定量法には、薄層クロマトグラフによる方法、²⁾ガスクロマトグラフ (GC) による方法、³⁾⁻⁷⁾高速液体クロマトグラフ (HLC) による方法^{8), 9)}など

があるが、BAとパラベン類の同時定量法の報告はあまりない。

著者らはこれまでは後述の紫外線吸収スペクトル分析法 (UV法) (図7) を用いて、ドリンク剤中の防腐剤の定量を行ってきた。この方法はパラベンを加水分解しパラオキシ安息香酸 (POBA) として定量するため、表1による適否のみを問題にする場合はさしつかえないが、個々のエステルの組成含量を知りたい場合には不十分である。

そこで今回、HLC法によるBAとパラベン類の同時定量法について検討したところ、簡便で精度の良い結果を得たので報告する。

II. 実験方法

1. 高速液体クロマトグラフ装置

検出器 UV-254nm, Iatron UvigraphLC-1

記録計 日本電子科学製卓上形自動平衡記録計

分離管 ガラスカラム (内径5mm×500mm) にイアトロビーズ6CP2020 (スチレンジビニルベンゼンポリマー) を充填したもの

2. 試薬及び試液

BA 和光純薬製試薬特級を1回再結晶したもの

パラベン 東京化成製試薬特級を1回再結晶したもの

BA標準溶液 BA100mgをエタノール100mlに溶かしたもの

パラベン標準溶液 パラオキシ安息香酸エチル (POBA-E), パラオキシ安息香酸-n-プロピル (POBA-P), パラオキシ安息香酸-n-ブチル (POBA-B) 各々100mgを同一のメスフラスコにとりエタノールで100mlとし、さらにその10mlをエタノールで100mlとしたもの

その他、使用した試薬はすべて試薬特級を用いた。

3. 試 料

昭和51年及び52年に県薬務課より検査依頼のあった収

* 千葉県衛生研究所

** 千葉県柏保健所

(1979年5月10日受理)

去品から20銘柄のドリンク剤を選び試料とした。

4. 定量法

ドリンク剤10mlを分液ロートにとりエーテル15mlずつで3回抽出し、エーテル層は0.1N塩酸30mlで3回洗浄したのちエーテルを留去し、残留物をエタノール5mlに溶解して試料溶液とする。BA標準溶液、パラベン標準溶液及び試料溶液を各々4 μ lずつHLCに注入し、得られたピーク高の絶対比較法により試料溶液中のBA及びパラベンの濃度を求め、ドリンク剤中のそれぞれの含量を算出する。この時、試料溶液のピークが標準溶液のピークより高い場合は、試料溶液を適宜希釈して再度測定を行ない含量を算出した。

HLCの条件は次のとおりである。

(1) 溶離液

水10%, 25%アンモニア水0.001%を含むメタノール(用時調製)

(2) 流速

2.0ml/min

(3) カラム温度

室温

(4) 検出器感度

0.08 A U F

(5) 記録計感度

10mV

(6) チャート速度

1.25cm/min

III. 実験結果

1. クロマトグラム

図1にBAとパラベンの保持時間及びピーク高を示した。また図2にBAとPOBA-E, POBA-P, P

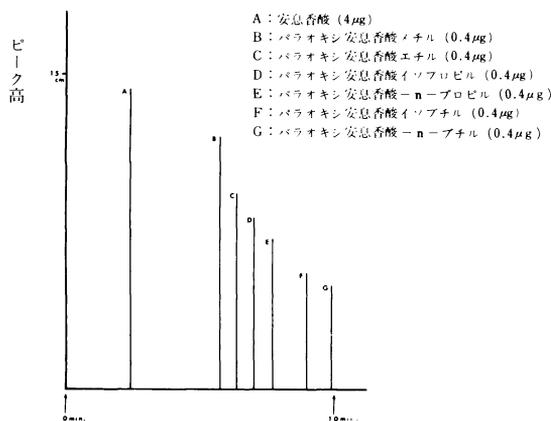


図1 防腐剤の保持時間とピーク高

OBA-Bのクロマトグラムを示した。また図3にパラオキシ安息香酸メチル, パラオキシ安息香酸イソプロピル, パラオキシ安息香酸イソブチルのクロマトグラムを示した。図1から図3はいずれもII-4定量法のHLC

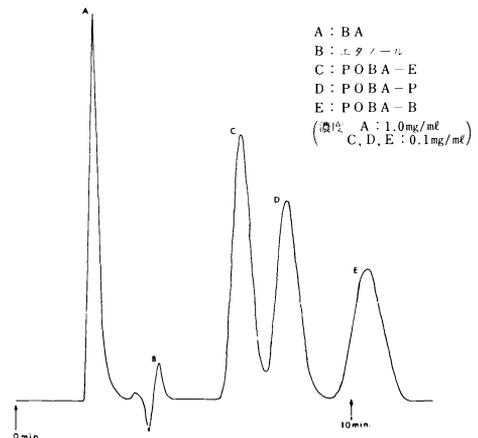


図2

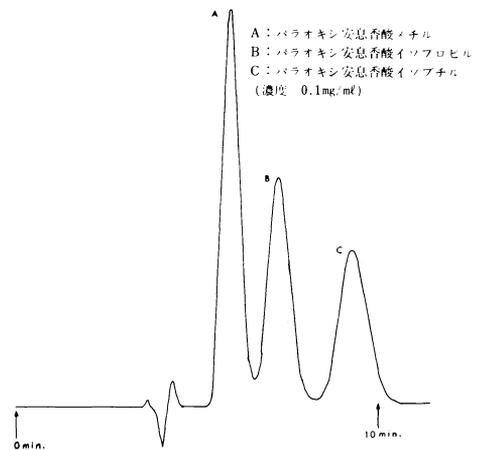


図3

条件で行なったものである。図から分かるように6種のパラベンのうち、隣り合う2種のパラベンの分離は不十分であるが、試料20銘柄に使用されていたパラベンはPOBA-E, POBA-P, POBA-Bのいずれかであったので問題はなかった。また図2でPOBA-EとPOBA-Pのピークのすそが多少重なっているが、分離度*は1.22であり、かつ試料中この両者を同時に含有するものはひとつもなかった。

2. 吸光度

BA, POBA-E, POBA-P, POBA-BのUV吸収曲線を図4に示した。BAは254nmにおける吸光度が非常に小さく、濃度0.01mg/ml, 層長1cmで約0.07であったが、ドリンク剤中の配合量が20~60mg/100mlで

あるため試料溶液中のBA濃度は0.4~1.2mg/mlとなり254nmでの測定が可能であった。

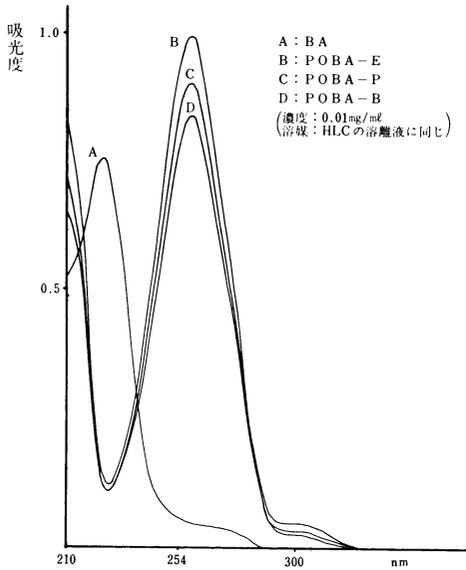


図4 紫外外部吸収曲線

3. 再現性

標準溶液についてII-4定量法のHLC条件で連続5回注入を行なった時の変動係数は次のとおりであった。

- BA : 1.70%
- POBA-E : 0.35%
- POBA-P : 0.77%
- POBA-B : 1.68%

4. 検量線

II-4定量法のHLC条件で作成した検量線を図5及び図6に示した。

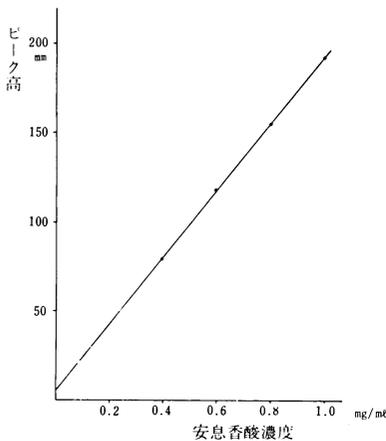


図5 安息香酸検量線

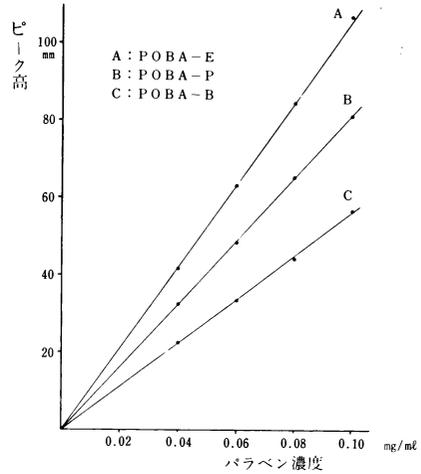


図6 パラベン検量線

5. 回収率

BA 不含のドリンク剤に BA 4 mg/ml エタノール溶液 1 ml を加え、以下 II-4 と同様に操作した時の回収率は 3 回の平均で 96.8% であった。

またパラベン不含のドリンク剤に POBA-E, POBA-P, POBA-B の 1 mg/ml エタノール混液を 0.4 ml 添加し同様に操作した時の各パラベンの回収率は、3 回の平均で POBA-E : 97.9%, POBA-P : 97.1%, POBA-B : 98.6% であった。

IV. 考 察

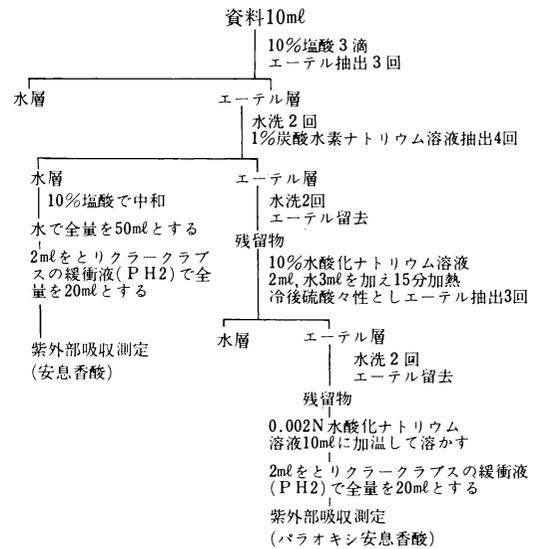


図7 UV法の前処理のフローシート

これまで著者らが行ってきたUV法を図7に示した。また表2に、同一試料についてのUV法とHLC法による定量値を示した。HLC法によるPOBA値は、個々

表2 ドリンク剤100ml中のBAとPOBAの定量値 (単位 mg)

試料 No.	BA		POBA					
	UV法	HLC法	UV法	HLC法				
				POBA-E	POBA-P	POBA-B	POBA	
1	45.6	44.4	7.2		4.9	4.9	7.2	
2	19.1	20.7	2.6				3.4	2.4
3	17.3	17.0	9.3	7.7			5.2	10.1
4	31.6	32.6	7.8	4.9			6.0	8.4
5	40.0	39.1	2.2				2.9	2.1
6	47.7	48.8						
7	57.2	56.2	5.3				7.2	5.1
8	48.0	45.5						
9	39.1	35.7	8.4	4.9			7.1	8.5
10	58.5	54.2	7.2		7.1		2.8	7.4
11	49.1	47.6	7.2	6.0			3.9	7.7
12	34.5	32.3	2.5				2.9	2.1
13	54.8	59.0	9.2				13.7	9.8
14	48.5	48.5	6.0				8.7	6.2
15	56.0	52.3						
16	51.5	45.6						
17	47.7	46.4	7.0		4.9		5.0	7.3
18	50.7	50.8	6.7				10.0	7.1
19	49.4	48.6	4.9				7.0	5.0
20	N. D	2.7	6.4	4.0			4.5	6.5

に定量したパラベン値から計算で求めたものである。

二法により求められた測定値の関係を図示すると、図8及び図9のようになり、BAについては $y = 1.029x - 0.544$ 、POBAについては $y = 0.887x + 0.541$ の回帰直線が得られた。(xはHLC法による定量値、yは

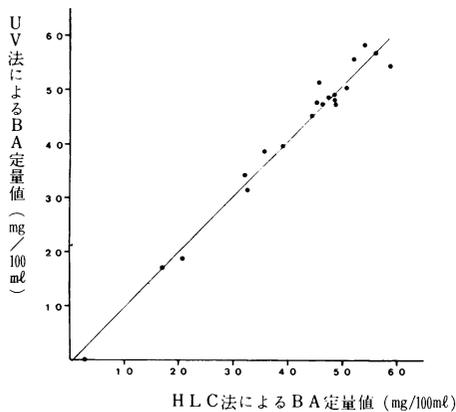


図8 UV法とHLC法のBA定量値の相関

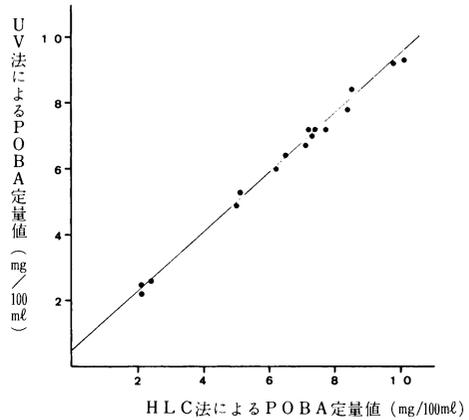


図9 UV法とHLC法のPOBA定量値の相関

UV法による定量値) 相関係数はBAについては $r = 0.988$ 、POBAについては $r = 0.997$ であった。

以上今回検討したHLC法の特長を述べると次のようになる。

- (1) 試料量はUV法と同量の10mlでよい。
- (2) 試料溶液の調製が簡単である。
- (3) パラベンについては、各種類別含量が求められる。
- (4) 分析時間が短い。
- (5) UV法による測定値とよく一致する。

なお、ある試料ではUV法及びGC法で、BAが検出されなかったにもかかわらず、HLC法ではBAの溶出位置にピーク高約9mmの小ピークがあった。この妨害物が他の試料にも含まれている可能性があるため、この妨害物について検討の必要があろう。しかし、BAについてはUV法とHLC法がかなりよく一致していることから、その妨害物の影響はごく小さいものと思われる。

V. 結 論

従来UV法で行ってきたドリンク剤中の防腐剤の定量法をHLC法によって検討したところ、BA、POBA-E、POBA-P、POBA-Bの4成分について回収率及び再現性の良好な定量法が得られた。この定量法とUV法との比較を行なったところ、BAについてはよい一致を示し、パラベンについても比較的よい一致が得られた。この定量法は操作が簡便で所要時間も短くてすむなどの利点があるため、今後、従来のUV法に代って実際にドリンク剤の定量に適用できるものと思われる。

※分離度 (R)

$$R = 2(t_{R2} - t_{R1}) / (W_1 + W_2)$$

t_r : retention time W : peak width

VI. 文 献

- 1) T. R. Aalto et al.: p-Hydroxybenzoic acid esters as preservatives, *J. Am. Pharm. Assoc. Sci. Ed.*, 42, 449-457, 1953
- 2) R. Rangone, C. Ambrosio: Identification and quantitative analysis of p-Hydroxybenzoic acid and its esters using reversed phase thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, 50, 436-441, 1970
- 3) E. Weisenberg et al.: Micro-determination of p-Hydroxybenzoic esters in pharmaceuticals and cosmetics, *J. AOAC*, 60, 56-59, 1977
- 4) P. Daenens, L. Laruella: Column chromatographic clean up and gas-liquid chromatographic determination of Hydroxybenzoic esters in food, *J. AOAC*, 56, 1515-1517, 1973
- 5) M. Wilcox: Gas chromatography of alkyl ether derivatives of p-Hydroxybenzoate esters, *J. Pharm. Sci.*, 56, 642-644, 1967
- 6) 樽府直大, 他: 食品添加物のガスクロマトグラフィーによる定量法の研究 (第2報), *食衛誌*, 10, 186-189, 1969
- 7) 加藤三郎: パラオキシ安息香酸エステル類のガスクロマトグラフィー, *衛試報告*, 84, 25-29, 1966
- 8) F. A. Fitzpatrick et al.: Quantitative analysis of methyl and propylparaben by high performance liquid chromatography, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, 26, 377-387, 1975
- 9) 高槻圭悟, 他: 高速液体クロマトグラフィーによる食品中の保存料, サッカリンの分析, *宮城県衛生研究所年報*, 94, 1975

The Study of Preservatives in DORINKUZAI The Determination Using High-Speed Liquid Chromatography

Keiko NAKAJIMA, Mikiko MIYAMOTO and Toshiko YASUDA

Summary

The application of high-speed liquid chromatography to the determination of the preservatives contained in DORINKUZAI (oral solution) was studied.

Benzoic acid, ethylparaben, n-propylparaben and n-butylparaben were determined basing on the technique of ethereal extraction of DORINKUZAI (oral solution) followed by the high-speed liquid chromatography on a styrene di-vinyl benzene polymer column (5mm×500mm) using slightly alkalized methanol as the mobile phase.

Recovery percentage and reproducibility of these preservatives were satisfactory.

This new method was compared with the method of UV spectrophotometry.

The correlation between the two methods was also satisfactory.