

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 化粧品・医薬部外品中の微量不純物等の試験法及び規格設定に関する研究
(英語) Studies on analytical methods and standards of impurities in cosmetics,
quasi-drugs and their raw materials

研究開発実施期間: 平成31年4月1日～令和4年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 五十嵐良明
(英語) Yoshiaki Ikarashi

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・生活衛生化学部・部長
(英語) Head, Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences

II 研究開発の概要

本研究では化粧品・医薬部外品の品質及び安全性確保のために、国際的な議論の対象となっている微量不純物等に関する知見を集積することを目的に、これらの最終製品及び原料中の試験法を開発し、その妥当性を評価した。また、開発した標準試験法を用いて実態調査を行い、その結果を基に規格基準の必要性について検討した。

(1) 化粧品・医薬部外品中の分解生成物の試験法開発

分解生成物の不純物としては、ホルムアルデヒドとアクリルアミドを対象にした。ホルムアルデヒドは化粧品の配合禁止成分に指定されているが、化粧品に配合される他の高分子成分等の分解によって生成し、製品に存在する可能性がある。ホルムアルデヒドの試験法としては、アセチルアセトンで誘導体化し、生成物の吸光度を測定する方法が簡便であるが、本法の化粧品分析への適用は限定されることがわかった。空気や水質分野ではホルムアルデヒドを 2,4-ジニトロフェニルヒドラゾン (DNPH) で誘導体化し HPLC で分析する方法が標準試験法として示されている。そこで本研究では、この方法を化粧品分析に適用できるよう条件検討した。まず HPLC 条件は、ホルムアルデヒド DNPH 誘導体を他成分と分離可能な HPLC カラムとして ODS カラムを選択し、移動相にはアセトニトリル・水混液を用いた。次に、試料溶液の調製と誘導反

応に適切な溶媒を選択するため、各種試料への添加回収試験を行った。ホルムアルデヒドの DNPH 誘導体化率は、水よりアセトニトリルやテトラヒドロフラン中の方が高く、これらを用いて試料溶液を調製し、HPLC で分析する方法を構築した。

開発した方法を用いて、市販化粧品（化粧水、クリーム、美容液、日焼け止め、洗顔料、クレンジングオイル、シャンプー、口紅など）50 製品以上の実態調査を行った。化粧品からのホルムアルデヒドの抽出液としてアセトニトリルを用いたが、口紅のような脂溶性の高い製品や水分含量の多い製品では分散しないため、テトラヒドロフランと水との混液を用いて調製、誘導体化することにした。いずれの製品も家庭用品規制法における乳幼児用繊維製品中のホルムアルデヒドの規制値（検出しない、16 µg/g を超えない）未満で、ほとんどが定量下限未満であった。

本 2,4-ジニトロフェニルヒドラジン（DNPH）誘導体化 HPLC 法の多施設（6 機関で）バリデーション研究を行い、添加回収試験及び市販製品への適用試験により試験法の妥当性を確認した。各機関からあげられた各操作段階での注意点などを取りまとめ、日本薬学会編集の衛生試験法・注解案として作成した。

アクリルアミドを重合して製造する樹脂成分には、未反応または分解してできたアクリルアミドモノマーが存在する可能性があるものの、そうした成分の種類や化粧品製品における含有実態は不明である。ポリアクリルアミドを成分とする原料を調査した結果、医薬部外品原料規格（外原規）に記載されている成分は少なかった。外原規収載原料の純度試験にはアクリルアミドが設定されているものの、その含有限度値は高く、用いる試験法の感度も高くないと考えられた。今年度は、化粧品中に存在するアクリルアミドの抽出及び精製法について、加工食品の分析法に準じ、添加回収試験によって検討した。化粧品試料にサロゲート物質を添加し、水及びヘキサンを加えて振とう後、水層を分取、これを活性炭と C18 を連結した固相カラムに入れ、メタノールで溶出させることによって、試料に含まれるアクリルアミドを良好な回収率で抽出、精製することができた。以下、昨年度検証した、キサントヒドロール溶液を加えて誘導体化後、酢酸エチルで溶出したものを試料溶液とし、DB-5 カラムを装着した GC-MS で分析することとし、試験法を確立した。

ポリアクリルアミド並びにこれと類似構造を有する化合物を配合表示している化粧品及び医薬部外品をいくつか購入し、開発した方法で分析した。いずれの製品も問題なく分析が可能であり、アクリルアミドの含有量は定量限界未満であった。アクリルアミドは、これを成分とする原料の分解や未反応物に由来が限定されると考えられ、原料段階での品質管理が必要と考えられた。

（2）化粧品中の微量揮発性不純物の分析法に関する検討

化粧品に用いられる原料には、植物エキス等からの抽出操作や合成に有機溶媒を使用して製造されるものがある。一定のレベル以上の毒性を示す溶媒については、最終製品への残留の有無を確認することを目的とした試験方法が必要であると考えられる。

化粧品中の残留溶媒を分析する方法としてヘッドスペース GC 法を検討した。化粧水、乳液、シャンプー、コンディショナー、歯みがき、口腔洗浄液、ファンデーション、口紅という 8 種類の形態の化粧品製品に日本薬局方残留溶媒試験法記載のクラス 1、2A、2B を中心とする 28 種類の有機溶媒を添加して日本薬局方の方法で回収率を求めたところ、水溶性試料の方法では異常な回収率が得られる組合せがあったが、非水溶性試料の方法としてジメチルホルムアミド（DMF）に溶解又は分散させる方法では良好な回収率が得られた。この分析方法を 32 製品に適用して実態調査を行ったところ、評価対象の溶媒は不検出であった。

さらに、特異性の向上を目的としてヘッドスペース GC-MS 法を検討した。クラス 1、2A、2B の有機溶媒について機器条件を検討し、保持時間又は特有の m/z により検出が可能であった。GC 法より感度が向上した成分があった。しかし、一部の製品及び成分において製品の溶解や分散がしにくい問題や回収率の異常を確認した。そこで、抽出溶媒を乳酸エチルに変えて定量を行うこととした。すると、水抽出では界面活性剤の入っている化粧品では泡立ちが発生すること、水及び DMF 抽出ではファンデーションや口紅は分散し

にくい問題点があったが、乳酸エチル抽出では、化粧水、乳液は溶解、分散し、シャンプーでも泡立たずに分散し、口紅やファンデーションもボルテックスを用いることで均一に分散した。クラス 1、クラス 2A、クラス 2B、クラス C の溶媒の回収率は DMF と同様に良好であった。

EU は規則により、24 の香料化合物及び 2 つの天然香料について、一定濃度を超えて配合する場合は表示するよう定めている。わが国では表示義務のないこれら香料アレルゲンについて規制を行うためには製品中の含有量を分析する方法が必要である。香料化合物の分析例を調査し、従来カラムを用いた二次元ガスクロマトグラフィー及びイオン液体 GC カラムを用いた一次元 GC が有効であることが判明した。そこで、1,12-di(tripropylphosphonium)dodecane bis(trifluoromethanesulfonyl)imide phase を固定相とするイオン液体 GC カラムを用いた一次元 GC-MS により天然物を除く 24 の EU 表示指定成分を含む 31 成分を分析したところ、これらを分離可能であり、検出限界及び定量限界を設定できた。

(3) 化粧品・医薬部外品中の微量金属類の試験法の構築

ISO/CD 21392 のマイクロ波分解-ICP-MS による重金属試験法のインターラボラトリー試験に参加して得た試験条件等を精査した。第二回のアンチモン (Sb) のみを対象とした試験では、他機関に比べ低値となったため、原因究明した。原因として考えられる、Sb の分解液中の沈殿物や分解容器への吸着及び試料の不均一性を検証した結果、我々が先行研究で確立したマイクロ波分解条件では見られなかった分解容器への Sb の吸着が ISO/CD 21392 の条件では試料のマトリックスにより起こることが判明し、これを原因と特定し共有した。ISO 21392:2021 Cosmetics — Analytical methods — Measurement of traces of heavy metals in cosmetic finished products using ICP/MS technique は 2021 年 8 月に発出され、その成立に貢献した。

無機系化粧品原料中の鉛及びヒ素の、医薬部外品原料規格 2006 (外原規) の試験法と、先行研究で開発したマイクロ波分解法との比較を行った。マイクロ波分解-ICP-MS 法で鉛またはヒ素が検出された限度値が規定されている原料で両者の検出値を比較した結果、多くの原料で鉛及びヒ素の定量値は、外原規法に比べてマイクロ波分解法で値が高かった。鉛は特に、外原規法で低値を示し、外原規法により定量される鉛濃度は原料中の総鉛量を反映していないことが明らかとなった。

先行研究で確立した条件のマイクロ波分解-ICP-MS 法を用いて、市販化粧品を対象とした微量金属類含有実態調査の対象試料の拡充を行った。検出濃度で比較すると、多くの対象金属類はアイシャドウで高い傾向が認められた。無機系化粧品原料について、先行研究で確立した MW 分解条件と、ISO/CD 21392 のインターラボラトリー試験に参加して得たプロトコルによる MW 分解条件とで処理し、ICP-MS で測定した時の金属不純物の濃度を比較した。また、両分解条件で得られた検出濃度と外原規法で前処理し ICP-MS で測定した検出濃度についても比較し、外原規における改正すべき箇所、重金属関連項目の項目名の変更、限度値の変更、及び項目名や限度値の変更に伴って生じる課題等の洗い出しを行った。

人工体液を用いた化粧品からの金属類の溶出試験を行った。人工体液として、経口曝露および経皮曝露を想定した人工唾液、人工胃液、及び人工汗を用い、溶出操作は ASTM F3188-16、環境省告示第 19 号及び EPA Method 134 を参考にした。最も pH が低い胃液を用いてファンデーション及びアイシャドウについて実施したが、金属類の含有量に対して溶出割合は低値を示した。

(4) 化粧品中の特定報告族アミン類及び多環芳香族炭化水素類の分析法の開発

アゾ色素に由来する、発がん性を有するまたはその恐れのある芳香族アミン類 (PAAs) は特定 PAAs と呼ばれている。本研究では先行研究から引き続き、法定色素中の不純物としての特定 PAAs 分析法を検討した。先行研究では、メタノール含有塩酸にて抽出後、液性をアルカリ性に転じ、メチル-tert-ブチルエーテル (MTBE) にて液々振とう抽出し、GC-MS で測定する方法を構築した。この方法は一定の有用性が認めら

れたが、一部の特定 PAAs で検量線の直線性が悪く二字曲線となることや低回収率を示すことが認められ、分析法の改良が必要と考えられた。本研究では、分析法の改良を目的に MTBE による液々抽出法と珪藻土カラム抽出法を比較した。その結果、後者の方が各特定 PAAs の回収率が良好であった。また、GC-MS 測定時に PEG300 を共注入することで、注入口での特定 PAAs の分解や吸着が抑えられ、良好なピーク形状及び検量線の直線性が確保できることを明らかにした。この試験法を用いて色素中の特定 PAAs の実態調査を実施した。その際、化学構造中に特定 PAAs を有する難水溶性色素は、有機溶媒には良く溶け、かつ水にもわずかに溶けるため、GC-MS 測定溶液中にはわずかに存在し、GC-MS 測定時の熱分解による特定 PAAs の生成が疑われた。この点について、再検証を実施したところ、その影響は限定的であることがわかった。最終的に開発した試験法及び実態調査結果について、論文としてまとめ学術雑誌に投稿した。

多環芳香族炭化水素類 (PAHs) とは、原油由来製品の不純物や燃焼生成物等として存在する構造中にベンゼン環を 2 つ以上連なって有する化合物の総称であり、一部の PAHs については発がん性を有することから、国内外において様々な製品中の濃度が規制されている。近年、欧州では、直接皮膚や口腔に長期間もしくは短期間に繰り返し接触する可能性のある樹脂製品に含まれる 8 種類の PAHs について含有量規制が開始された。一方、化粧品についても石油由来のワセリンや流動パラフィンを含む製品が皮膚や口唇に使用される。本研究では、それらの製品又は製品原料に含まれる PAHs の分析法を開発し、その実態を明らかにすることを目的とした。はじめに、分析法の開発に必要な情報収集を実施したところ、薬局方では三局調和に基づき、USP から提案されたナフタレン換算による吸光光度法が検討されていた。この試験法は、ナフタレン換算のため、環数の異なる PAHs や測定波長に吸収のある酸化防止剤等の影響を受ける可能性があると考えられた。また、GC-MS を用いた事例では、原料（鉱物油・パラフィン・ワセリン等）及び製品（口紅等）中の 18 種類の PAHs を分析し、その実態を明らかにしていた。一方で、この分析法は夾雑物の影響を受けやすく、対象 PAHs の重水素化物を多種類使用する必要がある、さらに一部の PAHs については分離が不十分であった。そのため、夾雑物の影響を軽減するための精製法の検討や、分離条件の改善が必要と考えられた。そこで、前述の USP 提案法の検証を始めに行った。具体的には 19 種類の PAHs について、製品中濃度として 1~50 µg/g となるように 4 段階の濃度に調製した DMSO 溶液の紫外可視吸収スペクトルを測定した。その結果、Benzo[a]pyrene 等、複数の PAHs について製品中濃度が 10 µg/g 以下の場合に、USP 提案報で規定されているナフタレン標準液よりも吸光度が低くなった。そのため、これらの PAHs は欧州の樹脂製品の規制基準レベルは違反と判定できない事がわかった。また、PAHs が低濃度の溶液になるほど DMSO 自体が有する低波長側の吸収の影響を受けてしまうことが分かった。そこで、USP 提案法の抽出法を生かした上で、より感度及び精度の高い試験法の開発を目的に、対象 PAHs の HPLC-PDA 分析法を検討した。その結果、19 種類の PAHs を 1 種類のカラム及び溶離液条件で全て分離することは困難であった。そこで、移動相の溶媒をアセトニトリルからメタノールに変えることで、いくつかの PAHs については分離し同定可能となった。一方で、アセトニトリル使用時には分離していた PAHs のピークが重なることも確認された。そのため、これらの PAHs の分析には性質の異なるカラムや移動相液条件を組み合わせる必要があることが分かった。今後、実際のワセリンやパラフィン類中の PAHs の実態調査のためには、HPLC-PDA 及び FL による分析条件の最適化が必要である。

To improve the safety and regulation of cosmetics and quasi-drugs, we developed analytical methods for trace elemental impurities, organic solvents, harmful substances, and degradation products in the finished products and raw materials. Additionally, commercial cosmetic products and ingredients were surveyed using the developed methods.

1. Degradation products

Formaldehyde may be present in the finished products as it is a degradation product of certain polymer components. The developed method involved the derivatization of formaldehyde with 2,4-dinitrophenylhydrazine and the subsequent analysis using high performance liquid chromatography (HPLC). More than 50 commercially available cosmetic products were surveyed. None of the products exceeded the threshold limit values for formaldehyde in textile products for infants.

Acrylamide is an unreacted or decomposed monomer that may exist in resin components produced via the polymerization of acrylamide. However, its quantity in cosmetic products is unknown. Acrylamide was extracted by adding water and hexane, and derivatized with xanthohydrol. The sample solution was analyzed using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The acrylamide content of commercial cosmetic products is below the limit of quantification.

2. Volatile impurities

Organic solvents used for extraction and other purposes may remain in cosmetic products during manufacturing. The headspace GC-MS method was investigated as a method for detecting and quantifying these organic solvents. Good recovery was obtained using the residual solvent test method in the Japanese Pharmacopoeia, with dimethylformamide as the dissolving solvent. The use of ethyl lactate further improved the recovery and applicability. When this analysis method was applied to 32 products, the solvent to be evaluated was not detected in the subsequent fact-finding survey. Further, we aimed to develop an analytical technique using GC-MS and an ionic liquid GC column. This strategy was intended for application as a regulatory control approach for fragrance compounds that are required to be labeled in the EU, and it achieved good separation of these compounds.

3. Metals

A comparative study was performed between Pb and As quantities found in inorganic cosmetic ingredients using two test methods, the Japanese Standards of Quasi-Drug Ingredients 2006 (JSQI) and the microwave-assisted acid (MW) digestion method, developed in our previous study. The concentrations of these metal impurities obtained via MW digestion were compared under the conditions of the previous study and the ISO/CD 21392 interlaboratory study. A comparison of detection values obtained using the MW digestion and the JSQI method revealed areas that should be revised in the JSQI. Additionally, an elution test of metals from commercial cosmetic products was performed using an artificial gastric fluid with the low pH to estimate the maximum elution rate in simulated biofluids.

4. Certain primary aromatic amines and polyaromatic hydrocarbons

Several azo dyes are known to undergo chemical or enzymatic reduction reactions on the skin, in intestinal bacteria, or in the liver. This results in the cleavage of azo groups to form primary aromatic amines (PAAs), which are carcinogenic or potentially carcinogenic. This study aimed to develop an analytical method for the quantification of PAA impurities in synthetic organic colorants and clarification of their actual condition in colorants. The method developed in this study entails the ultrasound extraction of the synthetic organic colorant using hydrochloric acid containing 20% methanol,

followed by a conversion from acidic to alkaline conditions and subsequent extraction using a diatomaceous earth column. Using this method, we clarified the status of PAAs in synthetic organic colorants.

Because several polyaromatic hydrocarbons (PAHs) are carcinogenic, their concentrations in various products are regulated worldwide. In recent years, Europe has begun to regulate the content of eight PAHs in resin products that may come into direct contact with the skin or oral cavity. However, cosmetic products containing petroleum-derived Vaseline and liquid paraffin are also used on the skin and lips. The purpose of this study was to develop analytical methods for PAHs contained in these products and raw materials and to clarify their actual conditions. First, data necessary for the development of the analytical method was collected. Thereafter, the absorbance spectrophotometric method based on naphthalene conversion proposed by the USP was performed to analyze the PAH concentration. As a result, it was found that for some PAHs, it was not possible to measure concentrations at the regulatory standard level for resin products in Europe. Therefore, we investigated an HPLC-PDA analysis method for target PAHs. The analysis of these PAHs requires a combination of columns with different properties and mobile-phase component. In future, the optimization of analytical conditions using HPLC-PDA and FL will be necessary for the investigation of PAHs in Vaseline and paraffins.