化粧品の特種成分試験法の設定に関する研究 (V)*¹ ヘマトニック中ピロカルピンの分離同定法について

田村健夫, 戸谷哲也, 原田裕文 (東京都立衛生研究所)*²

Studies on Examination of the Specific Materials in Cosmetics (V)*¹ The Method of Separation and Identification of Pilocarpine in Hair Tonics.

Takeo Tamura, Tetsuya Totani, Hirofumi Harada
(Tokyo-to Laboratories for Medical Sciences)*²

The analytical methods for the test of pilocarpine in hair tonics were established by means of ion exchange methods, ultraviolet absorption spectra, precipitation reactions, color reactions and paper chromatography. Attempts to eluate the pilocarpine with *N*-HCl from the Amberlite IR-120 or Dowex 50 X-2 were unsuccessful, but suitable results were obtained from Dowex 50 X-1 (cross-linking 1).

Limits of identification of these methods are from 1.52 to 6.25 mg % of pilocarpine in the samples.
(Received March 24, 1964)

Pilocarpine は *Pilocarpus jaborandi* Holmes などから得られるアルカロイドで, (I) のように Hydrofuryl 環と Imidazole 環とを持ったやや特異な構造を有する。頭髮化粧品では, 刺激作用を有するところから

発毛促進が期待され, ヘマトニック中に塩類として通常 0.25 % 程度添加される事例も多いが, その固有の毒性和長期に連用される化粧品の性格からみて現在では使用が禁止されている。

しかしながら実際にヘマトニック中の Pilocarpine の分離同定を行なうことは, 処方成分によって乳化とか呈色の阻害などがおこり, 必ずしも満足すべき結果が得られず, また公定あるいは協定試験法としてもまだ確立されていない。ところで Pilocarpine のイオン交換樹脂による分離例もほとんど知られていないが, 著者らは特に Dowex 50, X-1, H型の 50 ~ 100 mesh のものを使用することによって高い再現性をもって分離確認しうることを見出したので報告する。

*¹ 前報 (IV), 田村健夫, 小泉清太郎, 加藤曜子:
東京都立衛生研究所年報, 13, 173 (1961).

*² 東京都新宿区百人町 4 の 539; Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo.

実験の部

1. 吸収スペクトルの測定

Pilocarpine-HCl 塩を *N*-HCl に溶解し 4 mg % 溶液を調製し, 紫外吸収スペクトルを測定すると Fig. 1 のとおり, その $\lambda_{\max}$ は 222 m μ 附近に認められる。

Fig. 1 Absorption spectra of the 4 mg % pilocarpine-HCl solution in *N*-HCl.

2. 検量線の作製

Pilocarpine-HCl 塩の各種の濃度における *N*-HCl 溶液について 222 m μ における吸光度を測定するに $C_{11}H_{16}O_2N_2HCl$ としてほぼ 5 ~ 100 μ g/ml までが Beer の法則に合致することが認められた。

Fig. 2 Calibration curve of pilocarpine.

3. 交換樹脂の Cross-linking と回収率

各種の酸性樹脂 (H型) 5 ml を 1 × 5 cm の Column に充填し、濃度 20 mg % の Pilocarpine-HCl 水溶液 10 ml を流したのち水洗する。この流出液について Pilocarpine の反応を行なうと、カルボン酸型樹脂では吸着が完全に行なわれないが、その他のスルホン酸型樹脂では交換速度がきわめて速やかに行なわれることが認められた。またこの種の樹脂からの溶離条件は溶媒として酸、塩基あるいは塩の種々の濃度のものについて検討を加えたが、溶離の難易は樹脂の cross-linking の差異によっ

Fig. 3 Relationship between recovery of the pilocarpine and crosslinking of the ion exchange resins.

I Dowex 50 × 1 III Amberlite 1R-112
II Dowex 50 × 2 IV Amberlite 1R-120

て著明な影響をうけることが認められた。その結果 Di-vinyl benzene の含有量が 1 % という極端に小さいところの Dowex 50 × 1 をえらび *N*-HCl を溶出溶媒に用いることによってはじめ 90 % 以上の回収率が得られた。これに反して Dowex 50 × 2 を使用すると回収率は 60 % 程度に低下し、Amberlite の類では crosslinking が小さいところの 1R-112 を用いてもわずか数 % で、1R-120 ではほとんど試験が不能となる結果を得た。

4. 溶出溶媒の容量の決定

Dowex 50 × 1, 4 ml を 1 × 5 cm の column に充填し、Pilocarpine 5 mg を交換吸着後 *N*-HCl を用い flow rate 30~40 drops/min. で溶出し、Pilocarpine が完全に溶出するに要する溶媒の量を決定するため各 fraction 10 ml 中の Pilocarpine の含有量を百分率で求めると Fig. 4 に示すとおり、10 から 20 ml の間がもっとも高く、定性試験を目的とする場合にはほとんど 50 ml で完結することが認められた。

Fig. 4 Relationship between recovery of the pilocarpine and volume of effluent.

5. ヘヤトニック中 Pilocarpine の分離操作

以上の基礎事実をもとにして、Chart 1 に示すような操作法を立案した。すなわちヘヤトニック中にはおよそ 50 % 以上のエタノールを含有しているが Dowex 50 × 1 はエタノールの共存下でも Pilocarpine をよく交換吸着するため、エタノールを留去することなく直接交換操作を行なった。ただ樹脂柱が水に浸漬されている状態でエタノールと接触すると収縮がおこり気泡の発生によって column 内の流れが均一に行なわれなくなるため、あらかじめ樹脂を 80 % エタノールで飽和したのち

試料を流し、さらにエタノールで洗って香料、油分などを除き、水洗ののち、*N*-HCl で溶出を行なった。溶出液は前記のとおり吸収スペクトルを測定したのち、蒸発乾固して過剰の塩酸を除き水 2 ml に溶かして後述するところの沈殿反応、呈色反応ならびにロ紙クロマトグラフィーを実施した。

Chart 1. Separation of pilocarpine in hair tonic.

6. 沈殿反応ならびに呈色反応

(1) 試験溶液 1 滴に次のアルカロイド沈殿試薬 1 滴を加えた。

(i) ヨウ素溶液: Wagner 試薬 (I_2 1.27 g と KI 2 g を少量の水に溶解し水を加えて 100 ml とする)

褐色沈殿

(ii) ライネッケ塩試液: 桃色沈殿

(iii) 塩化第二水銀試液: 白色沈殿

(2) Ekkert 反応: 試験溶液 2 滴にベンゼン 0.5 ml, 1% $KMnO_4$ 溶液 1 滴さらに過酸化水素試液 1 滴を加えてふりまぜたのち静置するとき, Pilocarpine の存在によってベンゼン層が紫色を呈する。

(3) Helch 反応: 試験溶液 2 滴に 2% ニトロプルンッドナトリウム溶液 1 滴および *N*-NaOH 1 滴を混和して数分間放置後, 2 *N*-HCl 2 滴を加える。このとき Pilocarpine が存在すれば液は褐赤色を呈し, さらに過酸化水素試液 1 滴を加えると赤色に変ずる。

7. ロ紙クロマトグラフィー

試験溶液ならびに対照用の 0.25% Pilocarpine-HCl 溶液の各 0.01 ml を同一ロ紙上の一端より 7 cm の位置に 1 cm の間隔をもうけてつけ, 風乾後 (i) *N*-BuOH: HOAc: H_2O (5:1:4) (ii) CH_3COCH_3 : $CHCl_3$:

H_2O : conc. NH_4OH 溶液 (30:5:4:0.2) を用いてそれぞれ展開し, 発色液にはヨウ化白金試薬 (10% $PtCl_4$ 溶液 1 ml に 4% KI 溶液 25 ml を加えたのち水を加えて 50 ml とする) を噴霧した。Pilocarpine は紫色の Spot を生じる。

実験結果ならびに考察

次に本試験法が実際の製品に対して適用可能か否かをしらべる目的で試供品および自製のもの 3 種, 市販品 14 種について検討し, さらにこれらの試料に Pilocarpine を添加して確認限界を求めた。

1. 本試験法検討に供した試料

a. 試供品

95% EtOH	75.0 wt %
H_2O	20.7
Perfume	2.0
Glycerol	2.0
<i>l</i> -Menthol	0.3

b. 試供品

95% EtOH	65.0 wt %
H_2O	16.7
Polyethyleneglycol 3000	15.0
Nikkol-HCO. 60.	1.0
(Polyoxyethylene Castor oil)	
<i>l</i> -Menthol	0.3

c. 市販品 ロン〇ーハートニック

d. 市販品 ブ〇ーハートニック

e. 市販品 紅〇ーハートニック

記載成分: Thiamine-HCl, Cholesterol, Menthol, Capsicum Tincture, Glycerol, Perfume

f. 市販品 加〇〇素

記載成分: Calcium Pantothenate, Pyridoxine-HCl, Ethynyl estradiol, Cholesterol, Glycerol, EtOH

g. 自製

Nikkol CO-20 (TX) HLB 9.8	1.0 g
(Polyoxy ethylene Castor oil)	
EtOH	50.0 ml
Pyridoxine-HCl	0.1 g
Glycerol	40.0 g
Bay Rum (高砂香料)	2.0 g
Cantharides Tincture	1.0 g
Capsicum Tincture	1.0 g
Quinine- H_2SO_4	0.1 g

水を加えて全量 100 ml とする。

h. ~ q. 市販品

2. Pilocarpine 添加試料の吸収スペクトル

前項1のb試料につき、その20 ml をとり Pilocarpine-HCl 2 mg を添加したものと無添加のものについて、それぞれイオン交換処理を行ない紫外吸収スペクトルを測定するに Fig. 5 のとおりである。すなわち Pilocarpine 無添加の場合でもわずかながら吸収を示し、このため Pilocarpine 添加試料の場合も純粋な Pilocarpine の同濃度のものに比してやや吸光度が高くなるが、最大吸収波長ならびに波形には著しい変化が認められなかった。

Fig. 5 Absorption spectra of samples.

- I Containing 2 mg of pilocarpine
II Containing no pilocarpine

3. 試料中 Pilocarpine の確認限界

Wagner 試薬による沈殿反応, Ekkert 反応ならびに Helch 反応に関し、実際の試料について確認限界を求め

Table I Limits of identification

Concentration of pilocarpine-HCl in samples (mg %)	Wagner's reagent	Ekkert's reaction	Helch's reaction
25.00	+	+	+
12.50	+	+	+
6.25	+	+	±
3.12	+	+	—
1.56	+	±	—

た結果は Table I のとおりである。

前記の各試料のうち Polyoxyethylene 型活性剤を含有するものはイオン交換 Column 内の水洗が 30 ml 以下で行なわれると Wagner の反応が Pilocarpine 不含のときでも陽性となるが、他の沈殿反応には影響がない。

また Ekkert 反応は日局¹⁾ならびに USP²⁾に収載されているが、前者では酸性、後者では中性の条件で行なっている。しかし反応時に酸性であると著しい感度の低下をまねくので、本法の目的では USP の方法を準用した。

ところで Helch の反応³⁾の場合、酸性にするまでの過程は Legal の反応と呼ばれ活性メチル、活性メチレンの反応として知られているが、同種の官能基の呈色反応である Raymond 反応などは Pilocarpine に対して陰性であった。

4. 口紙クロマトグラフィーによる分離感度

Table II のとおり酢酸・ブタノール混液で Pilocarpine と Pyridoxine がかさなり Thiamine と近接するが Quinine とはわかれ、Acetone 溶媒では Quinine とはかさなるが Thiamine とは完全に分離する。カンタリスチンキ、トウガラシチンキの共存は影響がない。確認限界は塗布量 0.01 ml 中約 25 μg で、試料 100 ml 中 25 mg の Pilocarpine-HCl の検出が可能である。

Table II Paper chromatography of pilocarpine and some other substances in hair tonics.

Substances	I				II			
	Solvents	Fluorescence*	Rfvalue	color	Rfvalue	Fluorescence*	Rfvalue	color
Pilocarpine-HCl		—		Blue	0.42	—		Blue
Quinine-H ₂ SO ₄		Violet	0.80	Blue	0.80	Violet	1.00	Blue
Pyridoxine-HCl		Violet	0.45	Blue	0.45	Violet	1.00	—
Thiamine-HCl		Violet	0.17	Blue	0.17	Violet	0.18	Blue
Cantharides Tincture		yellow	0.45	—	—	—	—	—
Capsicum Tincture		—	—	—	—	—	—	—

I n-BuOH : HOAc : H₂O (5 : 1 : 4)

II CH₃COCH₃ : CHCl₃ : H₂O : ConNH₄OH Soln. (30 : 5 : 4 : 0.2)

Toyo filter paper No. 50 at 20° ± 1°

* UV 3660 Å

終りにあたり、本研究に協力された東京化粧品工業会加藤曜子氏に感謝する。

文 献

- 1) U. S. P., XVI, p. 539.

- 2) J. P.; 7, P. 327.

- 3) C. H. Thienes, T. J. Haley: "Clinical Toxicology 3rd ed.", Lea & Febiger., Philadelphia, p. 378 (1955).