衛生化学
EISEI KAGAKU
28(6) 330-334 (1982)

染毛剤の分析 (第1報)

薄層デンストメトリーによる酸化染毛剤中の染料関連成分の定量¹⁾

大島晴美, 山田貞二, 野田直希,
早川順子, 宇野圭一, 樫府直大
愛知県衛生研究所

Analysis of Hair Dyes. I.

Determination of Hair Dye Ingredients in Oxidative Hair Dyes by Thin Layer Densitometry¹⁾

HARUMI OHSHIMA, SADAJI YAMADA,
NAOKI NODA, JUNKO HAYAKAWA,
KEIICHI UNO and TADAHIRO NARAFU
*Aichi Prefectural Institute of Public Health,
7-6, Nagare, Tsuji-machi, Kita-ku, Nagoya, 462*

(Received July 19, 1982)

In order to devise a simple and reliable method for the analysis of main components contained in oxidative hair dyes, determination by thin layer densitometry was examined and the following procedure was recommended.

Sample and standard solutions were spotted on a silica gel plate. The plate was developed with benzene-ethylacetate (1:1 v/v) for the separation of 2-nitro-*p*-phenylenediamine, 4-nitro-*o*-phenylenediamine, *o*-aminophenol, *m*-aminophenol, *p*-aminophenol, resorcinol and with ethylacetate for *p*-phenylenediamine, toluene-2,5-diamine, *p*-methoxy-*m*-phenylenediamine. The plate was sprayed with Ehrlich's reagent and each ingredient was visualized by heating for 30 min at 70°C. Densitometric determination was carried out with dual-wavelength TLC scanner.

The proposed method was applicable to the analysis of hair dye ingredients without influence of contaminants in commercial hair dyes.

Keywords — thin layer densitometry; hair dye ingredient; oxidative hair dye; Ehrlich's reagent; determination

緒 言

昭和55年薬事法の改正により *p*-フェニレンジアミン (PPD) 等を配合した酸化型染毛剤には使用期限の表示が義務づけられた。^{2a)} 又、フェニレンジアミン類、アミノフェノール類等は成分表示の対象成分に指定された。^{2b)}

酸化型染毛剤は PPD, *o*-アミノフェノール (OAP) 等の染料中間体と *m*-アミノフェノール (MAP) 等のカップラーが有効成分として配合され、染毛効果はこれら染料関連成分の酸化成績体に基づいている。³⁾

染毛剤の安全性に対する検討は、既に多くの研究者に

より行われ、その結果、染料関連成分の一部に微生物に対する突然変異原性がみられると報告されている。⁴⁾ このように安全性のチェックは、広汎に展開されている反面、分析法に関する報告はほとんどみあたらない。⁵⁾

今回、簡易かつ信頼性のある分析法を確立する目的で、市販の酸化染毛剤に比較的使用頻度の高い9種類の染料関連成分を対象に、薄層デンストメトリーによる一斉分析を検討した。

実 験 の 部

1. 検体 8社81品目の酸化染毛剤を検体とした。
2. 試薬 レゾルシノール (RES), MAP, トルエ

ン-2,5-ジアミン2塩酸塩 (T25 D $\cdot$ 2 HCl), 2-ニトロ-*p*-フェニレンジアミン (2NPPD), 4-ニトロ-*o*-フェニレンジアミン (4NOPD), および *p*-メトキシ-*m*-フェニレンジアミン硫酸塩 (ANI $\cdot$ H₂SO₄) は東京化成製を, OAP, および *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドは和光純薬製を, *p*-アミノフェノール (PAP) は関東化学製を, PPD は片山化学製の試薬特級品をそれぞれ使用した. TLC プレートは, メルク社製 TLC プレートシリカゲル60 (0.25 mm 厚) を使用した. 有機溶媒は使用前に市販特級品を常法により蒸留した.

3. クロマトスキャナ 島津製作所製 CS-900 型2波長 TLC スキャナを使用した.

4. 実験方法 1) 染料関連成分標準溶液——RES, OAP, MAP, PAP, PPD, 2NPPD, 4NOPD および T25D は 10 mg を, ANI は 20 mg をそれぞれ秤取した. これにエタノールを加え溶解し, 全量を 10 ml とした溶液をそれぞれの標準原液とした. 標準原液をエタノールで段階的に希釈して, 標準溶液を調製した. 市販の T25D, および ANI は塩型であったので, 標準溶液を調製する際にアンモニア試液を加え, 遊離型に変換して使用した. なお, 標準原液, および標準溶液は用時調製した.

2) 試料溶液——染料関連成分 3 mg (ANI は 6 mg) に対応する染毛剤を精密に量り, エタノールを加え全量を 10 ml にして, 試料溶液とした.

3) 定量法——濃度の異なる 4 種類の標準溶液それぞれ 2 μ l と試料溶液 2 μ l をプレートに点付し, 展開溶媒 (a) で 10 cm 展開した. プレートを風乾後, 検出試薬を均一に噴霧し, 70°C, 30 分間加熱して発色させた. 各スポットの発色強度をクロマトスキャナで測定した. 標準溶液の濃度と発色強度より検量線を作成し, これにより試料溶液中の各染料関連成分の含量を計算した. *R_f* 値 0.25 までのスポットの定量には展開溶媒 (b) を用い, 同様に操作して染料成分の含量を求めた. 展開溶媒 (a): ベンゼン-酢酸エチル (1:1 v/v), 展開溶媒 (b): 酢酸エチル, 検出試薬: 1% *p*-ジメチルアミノベンズアルデヒドエタノール溶液-濃塩酸 (3:1 v/v). クロマトスキャナ条件—— λ_R : 700 nm, スリット: 1.25 $\times$ 1.25 mm², モード: 反射, ジグザグスキャン, λ_S : OAP, MAP, PAP=440 nm, 2NPPD, 4NOPD=470 nm, PPD, T25D, ANI=490 nm, RES=540 nm. 検出試薬の噴霧は定圧の窒素ガスと噴射びん (カーマック社製) を用い, プレートより 30 cm 離して一定速度で行った.

4) 回収率——Table I に示したモデル染毛剤を調製

TABLE I. Composition of Model Hair Dye

Chemicals	Content
<i>p</i> -Phenylenediamine	0.3
Toluene-2,5-diamine	0.4
<i>p</i> -Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	0.5
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	0.3
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	0.3
<i>o</i> -Aminophenol	0.3
<i>m</i> -Aminophenol	0.3
<i>p</i> -Aminophenol	0.3
Resorcinol	0.3
Sodium sulfite	0.5
Ammonia water	10.0
Sodium edatate	0.5
Isopropanol	10.0
Propylene glycol	10.0
Oleic acid	10.0
Sodium alkylbenzenesulfonate	5.0
Macrogol 400	20.0
Polyoxyethylene octylphenyl ether	10.0
Distilled water	21.0

Each value was shown as w/w percent concentration.

した. この 1 g を正確に秤量し, エタノールを加えて全量を 10 ml とした. この 2 μ l をプレートに点付し, 以下 3) の定量法に従い染料関連成分の含量を求め回収率を計算した.

結果および考察

1. 展開溶媒の検討

展開溶媒として *n*-ヘキサン, ベンゼン, クロロホルム, 酢酸エチル, アセトン, およびメタノールの単一あるいは混合溶媒系を用い, シリカゲルプレートに標準溶液を点付して, それぞれの分離度を検討した. Table II に *R_f* 値の一例を示したが, 検討した溶媒系のうちではベンゼン-酢酸エチル (1:1 v/v) が最も良好な分離を与えた. 又, PPD, T25D, および ANI の分離には酢酸エチル単独による展開が良好であったので, 9 種類の染料関連成分の分離にはこの両者の溶媒系を選択して使用した. シリカゲルプレート以外にアルミナプレートも検討したが, ほとんどの染料成分はテーリングもしくはリーディングをおこし, 実用には供しえなかった.

2. 発色条件の検討

発色における反応温度と反応時間との関係を検討した. OAP をサンプルとして, 展開・風乾後, エールリッヒ試薬を噴霧して, 60°C, 70°C, および 80°C の各温度で, 15 分, および 30 分間加熱した. その結果, 60°C, 30 分間, および 70°C, 15 分間加熱では発色が不十分であった. 又, 80°C, 15 分間の加熱では背後が黄色に発色し,

Fig. 1. Calibration Curves for Hair Dye Ingredients

—△—: *m*-aminophenol, —▲—: *p*-aminophenol, —○—: 2-nitro-*p*-phenylenediamine,
 —●—: *p*-phenylenediamine, —△—: *o*-aminophenol, —□—: toluene-2,5-diamine,
 —●—: 4-nitro-*o*-phenylenediamine, —■—: resorcinol, —■—: *p*-methoxy-*m*-phenyl-
 enediamine.

TABLE II. R_f Values of Hair Dye Ingredients on TLC

Hair dye ingredient	Solvent (a)	Solvent (b)
<i>p</i> -Phenylenediamine	0.12	0.29
Toluene-2,5-diamine	0.16	0.36
<i>p</i> -Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	0.22	0.44
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	0.51	0.71
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	0.42	0.70
<i>o</i> -Aminophenol	0.63	0.78
<i>m</i> -Aminophenol	0.55	0.78
<i>p</i> -Aminophenol	0.37	0.58
Resorcinol	0.68	0.85

Plate: Merck TLC plate silica gel 60 (0.25 mm thickness).
 Solvent (a): benzene-ethylacetate (1:1 v/v), solvent(b): ethylacetate.

Detection: Ehrlich's reagent.

TABLE III. Recoveries of Hair Dye Ingredients in the Model Hair Dye

Hair dye ingredient	Recovery (%)
<i>p</i> -Phenylenediamine	108.0
Toluene-2,5-diamine	91.6
<i>p</i> -Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	104.4
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	97.0
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	93.0
<i>o</i> -Aminophenol	90.0
<i>m</i> -Aminophenol	101.0
<i>p</i> -Aminophenol	90.3
Resorcinol	95.3

ットも加熱処理2時間経過後も退色せず一定の発色強度を示した。

3. 検量線

4種類の濃度の異なる各標準溶液 (0.1 mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.4 mg/ml, 又は0.5 mg/ml. ANIは0.2 mg/ml, 0.4 mg/ml, 0.6 mg/ml, 1.0 mg/ml) 2 μ lをプレートに点付し, 4-3)の定量法に従い作成した検量線を Fig. 1に示した. T25D, 4NOPD,

OAPのスポットと紛らわしく測定が困難であった。検討した条件のうちでは、70℃、30分間処理が最も高い積分値を与え、バックグラウンドの影響もなかった。OAP以外の成分でも、同条件下で満足される結果が得られた。呈色の安定性を経時的に検討したが、いずれのスポ

TABLE IV. Determination of Hair Dye Ingredients in Commercial Hair Dyes

Hair dye ingredient	n	Found, % of declared			
		≤80	80—90	90—110	>110
<i>p</i> -Phenylenediamine	36	3	2	26	5
Toluene-2, 5-diamine	32	9	8	14	1
<i>p</i> -Methoxy- <i>m</i> -phenylenediamine	12	5	2	4	1
2-Nitro- <i>p</i> -phenylenediamine	33	12	4	13	4
4-Nitro- <i>o</i> -phenylenediamine	7	2	2	3	—
<i>o</i> -Aminophenol	22	1	4	15	2
<i>m</i> -Aminophenol	16	8	5	2	1
<i>p</i> -Aminophenol	26	4	5	13	4
Resorcinol	50	26	5	16	3

および RES をのぞく 6 種類の成分は原点を通る良好な直線関係を示した。T25D, 4NOPD, および RES については 0.2—0.8 μg の濃度範囲内で直線関係が得られた。ANI は原点を通る直線関係を示したが、その濃度範囲は狭かった。検出限界を積分値10前後に選定すると、各染料関連成分の検出限界は次の通りであった。MAP, PAP: 0.1 μg , 2NPPD: 0.15 μg , PPD, OAP, RES, 4NOPD, T25D: 0.2 μg , ANI: 0.4 μg 。

4. モデル染毛剤による検討

Table I に従いモデル染毛剤を調製して、市販製剤分析への応用、および回収率を検討した。モデル処方中の各染料成分の *Rf* 値は標準品のそれと一致し、エールリッヒ試薬による発色の色調も標準品のそれと同一であった。回収率を Table III にまとめたが、いずれの成分も90%以上と良好な結果であった。

5. 市販染毛剤の分析

市販染毛剤81検体の分析結果は Table IV に示す通りである。2NPPD, MAP, ANI, および RES に関して、含量の低い製品が多くみられた。又、定性の検討で二、

三の製品より製造承認書に記載されていない染料成分が確認された。これらのことより、製造所において製品中の染料関連成分の安定性を含め、製品管理はもとより原材料の品質管理を十分に実施することが要望される。

結 論

市販酸化染毛剤中に配合頻度の高い9種類の染料関連成分について、薄層デンストメトリーによる分析法を検討した。プレートにシリカゲルを用い、ベンゼン-酢酸エチル (1:1 v/v), および酢酸エチルの二種類の展開溶媒系を組み合わせ、エールリッヒ試薬で検出した。定量操作は極めて簡易である。すなわち、検体をエタノールで希釈、又は溶解後、プレートに点付し、展開・発色させる操作だけであるので、操作中における成分変化の恐れがなく、又、他の配合成分によるクロマトグラム上での妨害もほとんどなかった。

故に本法は染毛剤分析の手段として、簡易かつ迅速な方法であり、十分実用に即応できる方法である。

謝辞 終りに臨み、本研究に多大な便宜を与えられた本所 井上裕正所長に厚く感謝します。

引 用 文 献

- 1) 日本薬学会第98年会 (1978年4月, 岡山) にて発表。
- 2) a) 昭和55年9月26日厚生省告示第166号; b) 昭和55年9月26日厚生省告示第167号。
- 3) 日本化粧品技術者会編, “化粧品科学ガイドブック,” 1979, p. 111.
- 4) a) B.N. Ames, O.H. Kammen, E. Yamasaki, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**, 2423 (1975); b) C.E. Searle, D.G. Harnden, S. Venitt, O.H.B. Gyde, *Nature* (London), **255**, 506 (1975); c) 吉川邦衛, 内野晴美, 倉田 浩, 衛生試験, **94**, 28 (1976); d) P.E. Perry, C.E. Searle, *Mutat. Res.*, **56**, 207 (1977); e) K. A. Palmer, A. Denvnizio, S. Green, *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, **1**, 87 (1977); f) G. Reznik, J. M. Ward, *Food Cosmet. Toxicol.*, **17**, 493 (1979); g) V.W. Mayer, C.J. Goin, *Mutat. Res.*, **78**, 243 (1980); h) C. Burnett, M.M. Jacobs, A. Seppala, P. Shubik, *J. Toxicol. Environ. Health*, **6**, 247 (1980); i) M.J. Prival, V.D. Mitchell, Y.P. Gomez, *Science*, **207**, 907 (1980); j) G.D. Rosalie, *Mutat. Res.*, **91**, 21 (1981); k) D.J. Kirkland,

-
- J.R. Honeycombe, S.D. Lawler, S. Venitt, C. Crofton-Sleigh, *Mutat. Res.*, **90**, 279 (1981).
- 5) a) I. Iordanova, *Khig. Zdraveopaz.*, **20**, 140 (1977); b) I. Iordanova, *Khig. Zdraveopaz.*, **21**, 83 (1978); c) G. Choudhary, *J. Chromatogr.*, **193**, 277 (1980).