毛髪中のジスルフィド結合の切断と
再生の評価法の検討

田中正一 飯村比幸子 杉山豊樹

Study of the test method of reduction and
recovery of disulfide bond in human hair

Shoichi Tanaka, Hisako Iimura, and Toyoki Sugiyama

From a viewpoint that disulfide bond (S-S stretching vibration) demonstrates the considerable strength of Raman activity, the (-S-S-) bond in hair treated with the permanent waving agent was studied by Raman spectroscopy. It was found that even with a single hair a favorable Raman spectrum can be obtained for a white hair, though not for a black hair. It was confirmed by the Raman spectroscopy that the band intensity of hair, at about 510cm^{-1} based on the (-S-S-) bond, reduced apparently upon treatment with the permanent waving agent 1st solution and increased again by treatment with the permanent waving agent 2nd solution to the former level.

It was feasible to examine the (-S-S-) bond of hair quantitatively by calculating a ratio of band intensity based on the (-S-S-) bond against that of amide I based on the peptide bond as the standard, (510cm^{-1})/(1665cm^{-1}). Raman spectroscopy which requires no troublesome pretreatment has shown that the degree of reduction or degree of recovery of the (-S-S-) bond of hair obtained for a series of the cold permanent waving agent models was in good agreement with previously reported results obtained by the determination of cysteic acid residues with amino acid analysis and/or infrared spectroscopy.

It was confirmed that the waving efficiency under treatment with the permanent waving agent and the degree of reduction of the breaking strength per sectional area of hair were influenced by the degree of reduction of the (-S-S-) bond under treatment with the 1st solution, and that with increasing the degree of reduction of the (-S-S-) bond of hair under treatment with the 1st solution, the waving efficiency became higher and the degree of reduction of breaking strength per sectional area of hair became larger.

1. 緒 言

毛髪は不溶性蛋白質であるケラチンから構成され、18種類のアミノ酸が縮合したものであり、光・温度などの外部的環境要因、ブラッシングなどの物理的要因およびパーマネントウェーブ剤(パーマ剤)などの化学的要因により損傷を受け、毛髪の表面及び内部構造は変化する。

ケラチン繊維の内部構造は、①水素結合、②塩結合、③ペプチド結合、④ジスルフィド(-S-S-)結合から構

成されている¹⁾。なかでも(-S-S-)結合は、例えば一般的なパーマ剤を例にとると、パーマ剤1液(還元剤)で毛髪中の(-S-S-)結合を切断し、整形後、パーマ剤2液(酸化剤)で再生するといった処理をとり、実生活で利用されている²⁾。一方、パーマ剤やブリーチ、ヘアダイなどの処理によって、これらの結合が切断され、毛髪の内部構造がルーズになり、皮質中の間充物質が流出し、次第にポーラスになったり、再結合が不充分であったりして、相当な損傷を与えらるゝといわれている。毛髪の物理的性質を知るうえでも、このような損傷を調べることは重要になっている。しかしこれらの結合の変化を毛髪有姿のままで分光学的に実証している例は少ない。特に(-S-S-)結合の切断については、間接的にシステ

ライオン(株)研究開発本部分析センター：東京都江戸川区平井7丁目13番12号
Analytical Research Center, Lion Corporation; 13-12, 7 chome, Hirai, Edogawa-ku, Tokyo, Japan

イン酸の増加をアミノ酸分析^{53)~55)}または赤外吸収スペクトルにおける $-\text{SO}_3\text{H}$ 基に基づく 1045cm^{-1} の吸収から検証^{62)~63)}しているにすぎない。著者らは、毛髪を有姿のまま、毛髪中の $(-\text{S}-\text{S}-)$ 結合の変化をラマン分光法により評価することを試みた。その結果、適切な条件のもとで毛髪中の $(-\text{S}-\text{S}-)$ 結合を定量的に評価できることを明らかにしたので報告する。併せてチオグリコール酸または臭素酸ナトリウム水溶液で処理した時の毛髪の物性評価と $(-\text{S}-\text{S}-)$ 結合の変化の関係についても調べたので報告する。

2. 実験

2.1 試薬

5(wt/v)% チオグリコール酸水溶液 (アンモニア水で pH 6.0, 8.5 または 9.6 に調整), 5(wt/v)% 臭素酸ナトリウム水溶液, アミノ酸標準物質: シスチンおよびシステイン (味の素㈱製)。

2.2 毛髪試料の調製

日本人健康毛髪 (黒髪, 白髪) を用いた。未処理毛, パーマ剤 1 液処理毛およびパーマ剤 2 液処理毛は次に示す方法で調製した。

(1) 未処理毛: 毛束を熱エタノールで洗浄し, 風乾した。

(2) パーマ剤 1 液処理毛: 未処理毛をチオグリコール酸水溶液に所定時間浸漬後, イオン交換水で充分すすぎ, 風乾した。

(3) パーマ剤 2 液処理毛: パーマ剤 1 液処理毛をイオン交換水ですすぎ, 水をよく除いた後, 臭素酸ナトリウム水溶液に所定時間浸漬し, イオン交換水ですすぎ, 風乾した。

2.3 ラマン分光法による毛髪の実験

ラマンスペクトルの測定には, 日本分光㈱製 NR-1000 型レーザーラマン分光光度計 (データプロセッサ付き) を用いた。励起光源としては, 日本電気㈱製アルゴンイオンレーザーを使用し, 514.5nm の発振線を出力 100mW で用いた。1 回の測定に用いる毛髪は 1 本で, 数 cm の長さの毛髪をファイバーホルダーに固定し, 次に示す条件で測定した。Entrance Slit: $700\mu\text{m}$, Intermediate Slit: $750\mu\text{m}$, Exit Slit: $700\mu\text{m}$, Slit Height: 4mm , Scan Speed: 2sec./div. , Repeat Time: 16, Sensitivity: 2 or 1, Time Constant: 0.2sec. , Spectral Range: $400\sim 1800\text{cm}^{-1}$

2.4 破断荷重の測定

毛髪を長さ 20mm になるように, テンシロメータ

—UTM-II 型 (東洋ボールドウィン社製) にセットし, 25°C , $65\%\text{RH}$ の恒温恒湿室にて, 引っ張り速度 20mm/min で破断荷重を測定する。また, あらかじめマイクロメーターを用いて, 毛髪の長径 (a) と短径 (b) を測定して断面積を算出し, 毛髪断面積当りの破断荷重を求める。なお, この操作は 10 回行い, その平均値を断面積当りの破断荷重とした。毛髪断面積当りの破断荷重の低下度は, 次に示す式により算出した。

$$\text{毛髪断面積当りの破断荷重の低下度}(\%) = 100(B-A)/B$$

A: パーマ剤処理毛における毛髪断面積当りの破断荷重

B: 未処理毛における毛髪断面積当りの破断荷重

2.5 ウェーブ効果率の測定

Kirby 法⁶⁴⁾ に準じて測定した。長さ 20cm , 重さ 0.3g の毛束を作成, 一端を輪ゴムでとめ, ウェーブ効果測定器具に巻き付け, 両端を輪ゴムでとめる。毛髪を器具ごとチオグリコール酸水溶液 100ml に, 25°C 所定時間浸漬する。次にイオン交換水ですすぎた後, タオルで水を除き, 臭素酸ナトリウム水溶液 100ml に, 25°C 所定時間浸漬する。更に, イオン交換水で充分すすぎ, 水中で毛髪を止め棒から静かにはずし, そのまま 10 分間放置する。その後, 毛髪を取り出し, タオルで水を除いた後, つり下げて長さを測定する。ウェーブ効果率 (%) は, 次に示す式で算出した。

$$\text{ウェーブ効果率}(\%) = 100\{1-(B-A)/(C-A)\}$$

A: 止め棒の 1 番目から 6 番目までの長さ (cm)

B: 1 番目から 6 番目までのカール頂点の実測値 (cm)

C: 6 つのカールを得るために用いた直毛の長さ (cm)

3. 結果及び考察

3.1 シスチンおよびシステインのラマンスペクトル

最初にアミノ酸であるシスチンおよびシステインを標準物質として, そのラマンスペクトルを測定し, ラマン分光法による $(-\text{S}-\text{S}-)$ 結合の評価の可能性について調べた。S-S 伸縮振動は赤外吸収スペクトルでは非常に弱い, ラマンスペクトルでは非常に強く現われる。

Fig.-1 に示すように, シスチンの S-S 伸縮振動に基づくバンドが 500cm^{-1} 付近にかなりの強度で現われることが確認できたので, 毛髪の $(-\text{S}-\text{S}-)$ 結合の評価も十分可能ではないかと考え, 次に毛髪を試料としてそのラマンスペクトルを測定した。

Fig.-1 Raman spectra of cystine and cysteine

3.2 毛髪のラマンスペクトル

一般的に、着色試料のラマンスペクトルを測定することは困難とされているが、汎用性を考慮して黒髪を用いて検討した。しかし、予想通り、黒髪については測定は困難であった。この原因としては、黒髪の場合、蛍光が極めて強いこと、レーザー光射部において温度が上昇し、試料が損傷を受け易いこと、更に黒髪自体がラマン散乱光の一部をも吸収することなどが考えられる。従って、蛍光の問題は残るにしても白髪であれば測定が可能になるのではないかと考え、全く着色していない白髪（太さ 80~100 μ m）を試料として検討を行った。白髪にレーザー光を照射すると、ラマン散乱光だけでなく、蛍光も発生するため、レーザー光照射直後では、バックグラウンドが大きい。白髪をファイバーホルダーにセットした状態でレーザー光を照射し続けると、蛍光強度は次第

に減衰し、ラマン散乱光の相対強度が十分に増大することがわかった。

Fig.-2 はこのようにして測定した、全く着色していない白髪のラマンスペクトルである。1本の毛髪でケラチンの構造を反映し良好なスペクトルが得られている。各バンドの帰属は成書¹⁰⁾に基づいて行った。ケラチンは高分子なので、シスチンに比べ、ラマンバンドの広幅化はまぬがれないが、510 cm^{-1} に S-S 伸縮振動に基づくバンドが明瞭に現われている。次に、(-S-S-)結合に基づくバンド強度を定量的に取り扱えないか検討した。全く着色していない白髪を用い、毛髪のペプチド結合に基づくアミド I のバンド (1665 cm^{-1}) を基準バンドとし、バンド高さからみたアミド I のバンド強度に対する (-S-S-) 結合に基づくバンド (510 cm^{-1}) の強度の比を求めた。結果を Tabl-1 に示す。

Fig.-2 Raman spectrum of a natural white hair

Table-1 Reproducibility of band intensity ratio (510cm⁻¹/1665cm⁻¹)

n	tested hair	band intensity ratio (510cm⁻¹/1665cm⁻¹)	
		A	B
1		0.831	0.781
2		0.831	0.761
3		0.810	0.757
4		0.859	0.806
$\bar{X}$		0.833	0.776
σ_{n-1}		0.020	0.022
C. V.		2.4	2.9

毛髪中の(-S-S-)結合の量は、Table-1に示されるように個人差が大きいが、同一の個人の白髪を用いれば、実用上実用上問題なく評価できることがわかった。また、白髪と黒髪のアミノ酸組成を比較検討した報告¹¹⁾によれば、シスチンの含有量は白髪と黒髪の間で特に差は認められていないので、パーマ剤処理に伴う(-S-S-)結合の評価には、白髪でも十分可能であると判断した。

3.3 パーマ剤処理に伴う毛髪の(-S-S-)結合の変化

コールド二浴式パーマ剤のモデル系として、パーマ剤1液に5%チオグリコール酸水溶液(pH 9.6)およびパーマ剤2液に5%臭素酸ナトリウム水溶液を用いて、白髪を処理した時の、白髪中の(-S-S-)結合の変化を

調べた。結果をFig.-3に示す。

(-S-S-)結合に基づくバンドの強度はパーマ剤1液処理で明らかに減少し、更にパーマ剤液処理で再び増大することを示している。このようにパーマ剤では、還元剤で(-S-S-)結合を切断し、酸化剤で再生させるという過程をとることをラマンスペクトルで初めて証明した。

ペプチド結合に基づくアミドIのバンドがパーマ剤処理の前後で大きな変化をしないと仮定すれば、パーマ剤処理に伴う毛髪中の(-S-S-)結合の切断率または再生率は次の式で求められる。

毛髪中の(-S-S-)結合の切断率(%) = $100(1 - P_1/B_0)$

P_1 : パーマ剤1液処理毛の S-S/Amide I バンド強度
 B_0 : 比未処理毛の S-S/Amide I バンド強度比

毛髪中の(-S-S-)結合の再生率(%) = $100(P_2/B_0)$

P_2 : パーマ剤2液処理毛の S-S/Amide I バンド強度比

3.4 パーマ剤1液処理条件と(-S-S-)結合切断率の関係

pH 6.0, 8.5, 9.6に調整したチオグリコール酸水溶液に、同一人の白髪を25°Cで一定時間(5, 15, 30分)浸漬後、水洗風乾した毛髪を試料として測定を行い、3.3項に示した式に従い(-S-S-)結合の切断率を求めた。

Fig.-4に示すように、チオグリコール酸水溶液のpHが高いほど、また処理時間が長くなるほど、毛髪中の(-S-S-)結合切断率は高くなることが認められた。pH

Fig.-3 Raman spectra of the hair before and after treatment with permanent waving agent

9.6においては、処理時間5分でも毛髪中の(-S-S-)結合切断率は50%以上に達しているのに対して、pH 6.0においては、処理時間30分でも切断率は5%に致らなかった。次に、チオグリコール酸水溶液(pH 8.5)の処理温度を25°Cまたは45°Cにして(-S-S-)結合の切断率を調べた。

Fig.-5に示すように、毛髪中の(-S-S-)結合切断率はパーマ剤1液処理温度が高くなることにより促進された。

3.5 パーマ剤2液処理条件と(-S-S-)結合再生率の関係

同一人の白髪をチオグリコール酸水溶液(pH 9.6)に25°Cで15分間浸漬、水洗し、余分な水分を除いた後、更に臭素酸ナトリウム水溶液に、25°Cで所定時間浸漬、水洗風乾した毛髪を試料として(-S-S-)結合再生率を求めた。

Fig.-6に示すように、パーマ剤2液処理を浸漬方式

で行った場合、(-S-S-)結合の再生率は、最初の5分でほぼ平衡に達し、90%前後の値を示した。一方、より実際の処理条件に近い、液滴下湿潤方式でも毛髪を処理し、(-S-S-)結合再生率を調べた。試料は、長さ20 cm、重さ0.3gの黒髪の同一人の白髪を混入させた毛束を作成し、これにチオグリコール酸水溶液(pH 9.6)3 mlを滴下、湿らせた状態で25°C、15分間放置、水洗、水分を除いた後、更に臭素酸ナトリウム水溶液3 mlを滴下、湿らせた状態で25°C、所定時間放置後、水洗風乾して調製した。液滴下湿潤方式の場合には、Fig.-6に示すように、パーマ剤1液処理時の(-S-S-)結合切断率は約25%と少なかった。そのためか2液処理すると再生率は5分で約90%の平衡状態に達した。毛髪中の(-S-S-)結合切断率はパーマ剤1液処理条件によって大きく影響されるが、いずれの場合でも(-S-S-)結合再生率は90%程度に達することがわかった。馬場ら⁴⁾は、パーマ剤によって処理した場合の毛髪のアミノ酸組

Fig. 4 Influence of pH of permanent waving agent 1st soln. on reduction of (-S-S-) bond at 25°C

Fig. 6 Influence of treatment time of permanent waving agent 2nd soln. on recovery of (-S-S-) bond

Fig. 5 Influence of treatment temperature of permanent waving agent 1st soln. (pH 8.5) on reduction of (-S-S-) bond

成を未処理毛の組成と比較し、システンの減少が著明であることを報告している。著者らの検討では、モデル系ではあるがパーマ剤2液処理により(-S-S-)結合は、数値上では約9割程度回復したこととなり、(-S-S-)結合が未処理毛と同じ状態で再生していない可能性も考えられ、これらについては今後検討してゆきたい。

3.6 パーマ剤処理回数と(-S-S-)結合再生率の関係
チオグリコール酸水溶液(pH 8.5)浸漬(15分または30分)、水洗風乾後、更に臭素酸ナトリウム水溶液浸漬(15分)、水洗風乾の操作を繰り返す行い、(-S-S-)結合再生率の変化を調べた。

Fig. 7 に示すように、パーマ剤処理の繰り返すによって、(-S-S-)結合再生率は減少した。またパーマ剤処理回数が同じ場合でも、パーマ剤1液処理時間が長い方が、(-S-S-)結合再生率が低下する傾向を示した。

3.7 パーマ剤処理毛髪のウェーブ効果率と毛髪断面積当りの破断荷重の低下度

毛髪をウェーブ効果率の測定法に従って処理した後、ウェーブ効果率と断面積当りの破断荷重の低下度との関係を調べた。毛髪の治療条件を Table 2 に、結果を Fig. 8 に示す。

Table 2 の条件でパーマ剤処理した場合、ウェーブ効果率が高いほど、毛髪断面積当りの破断荷重の低下度も大きくなる傾向が認められた。特に処理条件Aにおいては、

Fig. 7 Influence of treatment number of permanent waving agent on recovery of (-S-S-) bond

Table-2 Conditions of preparation of tested hair

No.	treatment with permanent waving agent 1st soln.		treatment with permanent waving agent 2nd soln.
	pH	treatment time	treatment time
A	9.6	30 min.	30 min.
B	9.6	15	15
C	8.5	30	30
D	8.5	15	15
E	6.0	30	30

Fig. 8 Relation between waving effect and breaking strength of hair treated with permanent waving agent

Fig. 9 Relation between waving effect and reduction of (-S-S-) bond of hair treated with permanent waving agent 1st soln.

Fig. 10 Relation between reduction of breaking strength and reduction of (-S-S-) bond of hair treated with permanent waving agent 1st soln.

ウェーブ効果率も高いが、断面積当りの破断荷重も著しく低下していた。しかし処理条件Aの場合でも、同一人の白髪を用いて行った(-S-S-)結合の再生率は90%程度に達していた。そこで、(-S-S-)結合再生率はTable-2に示す条件A～Eのいずれにおいてもほぼ一定であると

して、Fig.-4 に示したパーマ剤1液処理時の(-S-S-)結合切断率の値を用いて、(-S-S-)結合切断率と毛髪のウェーブ効果率または断面積当りの破断荷重の低下度との関係にプロットし直してみると、Fig.-9、Fig.-10に示すようになった。

Fig.-9、Fig.-10 に示すようにパーマ剤2液処理後の毛髪のウェーブ効果率および毛髪断面積当りの破断荷重の低下度は、パーマ剤1液処理時の(-S-S-)結合切断率と相関性をもっていた。すなわち、ウェーブ効果率および毛髪断面積当りの破断荷重の低下度は、いずれもパーマ剤1液処理時の(-S-S-)結合切断率の影響を受けていると考えられる結果であった。

田村¹²⁾はチオグリコール酸の濃度、アルカリ度とpHがウェーブ効果率、毛髪の損傷と深い関係にあることを報告しており、これらは著者らの検討からも確認された。

4. 総括

(1) ジスルフィド結合(S-S伸縮振動)がラマン活性であることに着目し、パーマ剤処理に伴う毛髪中のジスルフィド結合の評価についてラマン分光法により検討した。その結果、黒髪については測定困難であったが、白髪を用いて測定すれば、白髪1本で良好なラマンスペクトルが得られることがわかった。毛髪中のジスルフィド結合に基づく約 510cm^{-1} のバンド強度は、パーマ剤1液処理で明らかに減少し、更にパーマ剤2液処理で再び増加して回復することをラマンスペクトルから確認した。

(2) ペプチド結合に基づくアミドI(1665cm^{-1})のバンドを基準バンドとし、このバンド強度に対するジスルフィド結合に基づくバンド(510cm^{-1})の強度の比を求めれば、毛髪中のジスルフィド結合を定量的に取り扱うことが可能であった。実際に、コールドパーマ剤のモデル系について、毛髪中のジスルフィド結合の切断率あるいは再生率を調べたところ、煩雑な前処理としないラマン分光法によっても、システイン酸の増加をアミノ酸分析したり、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 基に基づく吸収の増加を赤外吸収スペクトル法により測定した従来の知見と一致する結果を得

た。

(3) パーマ剤処理時のウェーブ効果率および毛髪断面積当りの破断荷重の低下度は、パーマ剤1液処理時の毛髪中のジスルフィド結合の変化量すなわちジスルフィド結合の切断率の影響を受けており、切断率が大きいほど、ウェーブ効果率は高くなるが、一方毛髪断面積当りの破断荷重の低下度も大きくなることを明らかにした。

参考文献

- 1) M. S. Balsam and E. Sagarin, "Cosmetics Science and Technology Second Ed." p. 178 (1972) Wiley Interscience, New York
- 2) 大門一夫, フレグランス ジャーナル, No. 24, 46 (1977)
- 3) C. R. Robbins and C. Kelly, J. Soc. Cosmet. Chem., 20, 555 (1969)
- 4) 馬場典子, 中山弓子, 能崎章輔, 田村建夫, 衛生化学, 19, 47 (1973)
- 5) J. G. Gumprecht, K. Patel and R. P. Bono, J. Soc. Cosmet. Chem., 28, 717 (1977)
- 6) 田中昭二, 牧野辰也, 赤堀敏之, 風間成孔, 香粧会誌, 3, (2), 57 (1980)
- 7) C. Robbins, Textile Research J., 37, 811 (1967)
- 8) J. Strassburer, M. M. Breuer, J. Soc. Cosmet. Chem., 36, 61 (1985)
- 9) D. H. Kirby, Drug and Cosmetic Ind., 80, 314 (1957)
- 10) 坪井正道, 田中誠之, 田隅三生編集 "赤外・ラマン・振動[I]" p. 123 (1983) 南山堂
- 11) 青柳俊雄, 玉川大学農学部研究報告, 9, 131 (1969)
- 12) 田村建夫, フレグランス ジャーナル, No. 24, 52 (1977)

(第26回 SCCJ 研究討論会発表論文)

(1991年9月2日受理)