薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
103 (2) 236-239 (1983)

液・固クロマトグラフィーを用いる化粧品中のカプサイシン同族体の分離システム¹⁾

大西重樹,^a 米谷 融,^a 原 昭二*,^b

鐘紡株式会社化粧品研究所,^a 東京薬科大学^b

Liquid-Solid Chromatography Resolution System for Capsaicine Analogues in Cosmetic Preparation¹⁾

SHIGEKI OHNISHI,^a TOHRU YONEYA,^a and SHOJI HARA*,^b

Cosmetics Laboratory, Kanebo, Ltd.,^a Odawara, Kanagawa 250, Japan and Tokyo,
College of Pharmacy,^b Horinouchi, Hachioji, Tokyo, 192-03, Japan

(Received September 2, 1982)

In order to identify the constituents of capsicum annuum tincture and related additives in cosmetic preparations, the liquid-solid chromatographic resolution of capsaicine analogues was examined. For this purpose, binary solvents consisting of *n*-hexane as a diluent and various proton donor and acceptor solvents such as chloroform, diethyl ether, ethyl acetate, dioxan and ethanol as stronger components were used along with silica gel and chemically bonded packing columns. An eluent containing dioxan afforded maximum resolution for the group of solutes. Better results were obtained at lower temperatures. A phase system consisting of *n*-hexane-dioxan and silica gel at 0°C and incorporating a fluorescence detector was applied following a common clean-up procedure to the analysis of nonanoic acid vanillylamide, an additive in a hair tonic.

Keywords—HPLC; liquid-solid chromatography; capsaicine; dihydrocapsaicine; capsicum annuum tincture

トウガラシチンキは、その主成分であるカプサイシン (C) やジヒドロカプサイシン (DC) 等の毛根刺激、頭皮刺激あるいは止痒効果を期待してヘアートニック等に配合されている。一方、化学的合成品であるノナン酸ワニルアミド (NVA) も同様の効果を期待し、トウガラシチンキの代替として使用されている。

従来、ヘアートニック中のこれらの成分の確認には、試料を濃縮したのち、シリカゲルカラムでクリーンアップを行い、ついでガスクロマトグラフィー (GC) で分離する方法を採用していた。しかし同法は共存物質の影響を受け易い欠点があり、簡便な分析法の開発が必要になった。一方、カプサイシン同族体の分離には、加水分解したのち構成脂肪酸をエステル化し、キャピラリー GC で分離する方法²⁾や GC-MS で分離定量する方法³⁾あるいは C₁₈ シリカまたは C₈ シリカを充てん剤に用いる逆相液体クロマトグラフィー (RPLC) で分離する方法⁴⁾が報告されている。GC による場合加水分解が必要であり、RPLC による場合、NVA と C との分離のため溶離液中に銀イオンを添加することが必要である。

今回、著者らはヘアートニック中に数 ppm オーダーで配合されている微量の NVA などの分析を目的として、液・固クロマトグラフィー (LSC) による相システムを設計し、分析条件の最適化を行ったので報告する。

実 験 の 部

試薬 C の標準品はシグマ社製 (試薬の表示によれば約 20% の DC を含む) を用い、NVA は高砂香料㈱より入手した。C, DC のピークはそれぞれ MS により確認した。高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) の溶離液は試薬特級品を用いた。

HPLC カラム管は内径 4 mm、長さ 250 mm のステンレス製で、充てん剤としてシリカゲル Nucleosil 100-5、化学結合型シリカゲル Nucleosil 5NH₂, Nucleosil 5CN (いずれも西独, Nagel 社製) を平衡スラリー法で充てんした。送液ポンプは日立 635 型で、日立 650-10LC 型けい光検出器 (Ex 270 nm, Em 330 nm) を接続して用いた。溶離液の流速は 1.0 ml/min に設定し、カラム温度は循環恒温水槽を用いて制御した。

結果と考察

試料としてのカプサイシン (C), ジヒドロカプサイシン (DC) およびノナン酸ワニルアミド (NVA) の構造を Fig. 1 に示す. これらを LSC で分離するとき, 保持に寄与すると思われる官能基は $-\text{OH}$, $-\text{NHCO}$, $-\text{OCH}_3$ であるが, 分離にはこれらの 3 つの溶質の構造上の違いであるアルキル, アルケニル基部分の差異を利用する必要がある. 銀イオンを含む溶離液の RPLC による分離⁴⁾は, π 電子に対する親和性を利用するものであるが, ここでは銀イオンを用いず, 移動相溶媒, 固定相の選択性による分離を試みた.

移動相溶媒の選択

LSC における移動相溶媒の選択は経験的に行われ, 系統的な手法が確立されているとは言えない. 著者の一人 (原) は各種の溶媒を, 水素結合に無関係のもの O 型 (脂肪族炭化水素), π 電子をもつもの P 型 (芳香族炭化水素), n 電子をもつもの N 型 (ハロゲン化炭化水素) 等の希釈剤と, 水素結合の受容体 B 型 (エーテル, エステル, ケトン), プロトン供与・受容体 AB 型 (アルコール, カルボン酸) の強溶出溶媒に分類した.⁵⁾ それらの組み合わせを系統的に用意し, 最適な溶媒を選択することが可能となる.

容易に平衡化でき, 中位の極性をもつ化学結合型充てん剤として CN 型のカラムを用い, 系統的に調製された二成分溶媒系におけるカプサイシン同族体の保持挙動を調べた.

まず 3 つの試料を溶出するのに必要な溶媒強度を知るため, O 型希釈剤 n -ヘキサンに任意の割合で混ぜり, また広い強度の範囲の溶媒が調製出来る AB 型のエタノールを用いて実験を行った. Fig. 2 には CN 型シリカを充てん剤とし, カラム温度 0°C における強溶出溶媒のモル比の対数と保持比 (k' , n -ノナンを非保持ピークとして算出) の対数との関係を示した. 溶出順序はいずれの混合比でも DC, NVA, C の順であった. ただし, NVA との分離は必ずしも満足できるものではなかった. そこで, エタノールの代わりに N 型のクロロホルム, B 型のジエチルエーテル, 酢酸エチルおよびジオキサンについて検討した. 強溶出溶媒のモル比の決定はステロイドをモデル化合物とする等溶出溶媒系の設計法⁶⁻⁸⁾に従い, k' が概ね 3.5 になるような比率を選択した. ジエチルエーテルは溶出力が不足し, 酢酸エチル, クロロホルムはカラム効率の低下が著しく目的を達成することは不可能であったが, ジオキサンではカラム効率の向上が認められ, C と NVA の分離が改善された. ジオキサンのモル比と k' の関係について検討し, 両対数の直線関係がエタノールの場合と同様に成立することを確認した. そこで k' のコントロールを容易に行えることが明らかになった (Fig. 3).

Fig. 2. Correlation between the Logarithm of the Capacity Ratio and the Logarithm of Ethyl Alcohol Concentration

Column: Nucleosil 5CN, flow-rate: 1.0 ml/min, column temp.: 0°C , eluent: n -hexane+ethyl alcohol.
—○—: C, —×—: NVA, —●—: DC.

Fig. 1. Structural Formulae of Capsaicin Analogues

I: capsaicin (C), II: dihydrocapsaicin (DC),
III: nonanoic acid vanillylamide (NVA).

Fig. 3. Correlation between the Logarithm of the Capacity Ratio and the Logarithm of Dioxan Concentration

Eluent: n -hexane+dioxan, other conditions as Fig. 2.
—○—: C, —×—: NVA, —●—: DC.

以上の結果, CN 型カラムを用い, *n*-ヘキサン/ジオキサンを用いることにより, C, DC, NVA の分離が可能となったので, つぎに他のカラム充てん剤についても検討した. アミノ型シリカおよび球状シリカゲルについて同様の溶媒系を適用した. その結果, アミノ型シリカではテーリングの現象が現われカラム効率が低く, 分離の改善は認められなかったが, シリカゲルでは CN 型シリカカラムを用いた場合と比較して, 分離が改善された. カラム充てん剤としてシリカゲルを, 移動相溶媒として *n*-ヘキサン/ジオキサンを用いたときの保持値と溶媒組成との関係を Fig. 4 に示す.

カラム温度の影響

つぎにカラム温度の分離度に対する影響について検討した. ジオキサンの量を 25% および 30% とし, 0°C, 15°C, 30°C, 45°C の各カラム温度における NVA と C の分離度 R_s との関係を Fig. 5 に示す. 温度が低い程分離度が向上し, 強成分の含量を少なく, 保持時間を大きくして分離を改善する方法は適切でないことが示唆された. Fig. 6 に示すように, 45°C においてジオキサンを 30% 含む溶離液の分離例 (A) と 25% 含む溶離液の分離

Fig. 4. Correlation between the Logarithm of the Capacity Ratio and the Logarithm of Dioxan Concentration

Column: Nucleosil 100-5, flow-rate: 1.0 ml/min, column temp.: 0°C, eluent: *n*-hexane+dioxan
 —○—: C, —×—: NVA, —●—: DC.

Fig. 5. Effect of Column Temperature on Resolution of Capsaicin and Nonanoic Acid Vanillylamide

HPLC conditions as in Fig. 4.

eluent: —●—: 25% dioxan/*n*-hexane.
 —○—: 30% dioxan/*n*-hexane.

Fig. 6. Chromatograms of Capsaicin Analogues

HPLC conditions as in Fig. 4.

(A) column temp.: 45°C, eluent: 30% dioxan/*n*-hexane,
 (B) column temp.: 0°C, eluent: 30% dioxan/*n*-hexane,
 (C) column temp.: 45°C, eluent: 25% dioxan/*n*-hexane.

例 (C) とを比較するとき、保持の増大に伴う分離の改善は大きくないことが判る。一方、(C) の条件とほぼ同じ保持時間で溶出する、ジオキサンを 30% 含む溶離液、0°C のクロマトグラム (B) では、その分離が著しく改善されている。

化粧品試料への応用

以上の結果から LSC によるカプサイシン同族体の分離システムを設定し、化粧品の分析を行った。なお、カプサイシン同族体に対し、UV 検出器に較べ高感度であり、また選択性が高いことからけい光検出器を用いた。

試料 (50 g) に水 (50 ml) を加えたのち、クロロホルム (50 ml) で抽出する。ついで、クロロホルムを減圧下で留去したのち、残留物に *n*-ヘキサン (1 ml) を加え、これを試料溶液としてクロマトグラフィーを行う。市販ヘアートニック中の NVA を確認したクロマトグラムを Fig. 7 に示す。香料等に由来すると思われる他の成分ピークと分離されて、NVA が高い感度で検出された。シリカゲルカラムによるクリーンアップ操作を加えることにより妨害成分を除くことができるので、より多くの試料に本法を適用することが可能と考えられる。

結 言

LSC によるカプサイシン同族体分離システムを設計した。同法を用い、ヘアートニック中の NVA の確認を行ったところ迅速に分析することができた。医薬部外品主剤のルーチン分析、あるいは表示成分の品質保証の方法として応用可能である。

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第 102 年会において発表, 大阪, 1982 年 4 月.
- 2) J. Jurenitsch, R. Leinmüller, *J. Chromatogr.*, **189**, 389 (1980).
- 3) K. Iwai, T. Suzuki, H. Fujiwake, S. Oka, *J. Chromatogr.*, **172**, 303 (1979).
- 4) J. Jurenitsch, I. Kampelmühler, *J. Chromatogr.*, **193**, 101 (1980).
- 5) S. Hara, Y. Fujii, M. Hirasawa, S. Miyamoto, *J. Chromatogr.*, **149**, 143 (1978).
- 6) S. Hara, A. Ohsawa, *J. Chromatogr.*, **200**, 85 (1980).
- 7) 原 昭二, 平沢麻美子, 糸川秀治, 薬誌, **98**, 401 (1978).
- 8) S. Hara, M. Hirasawa, S. Miyamoto, A. Ohsawa, *J. Chromatogr.*, **169**, 117 (1979).

Fig. 7. Chromatogram of Nonanoic Acid Vanillylamide in Hair Tonic Preparation

HPLC conditions as follows;
 Column : Nucleosil 100-5 (4 mm i.d. × 250 mm),
 Flow-rate: 1.0 ml/min,
 Column temp.: 0°C,
 Eluent: 30%, dioxan/*n*-hexane,
 Detector: Fluorescence monitor
 (Ex 270 nm, Em 330 nm).