

毛髪用化粧品に配合される新規染毛用色素の分析法

大 貫 奈穂美*, 中 村 義 昭*, 森 謙一郎*, 寺 島 潔*,
横 山 敏 郎*, 荻 野 周 三*

Analysis of New Hair Colorants for Cosmetics

Nahomi OHNUKI*, Yoshiaki NAKAMURA*, Ken'ichiro MORI*, Kiyoshi TERAJIMA*,
Toshiro YOKOYAMA* and Shuzo OGINO*

A rapid and simple analysis by HPLC was developed to determine the 20 synthetic hair colorants in cosmetics. The analytical procedure was as follows: the samples were diluted with 50% methanol and injected into the HPLC. The HPLC conditions were as follows: HPLC column; ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm), mobile phase: 0.01 mol/L phosphate buffer including 0.5% sodium 1-decanesulfonate, pH 2.5 / Acetonitrile, stepwise condition, photodiodearray; 200-800 nm, column temperature; 40°C. Twenty hair colorants were separated for about 40 min and were identified from the absorbance spectra of each peak.

By using this method, hair colorants used in 10 commercial cosmetics were identified, quantified, and shown to have good handling qualities.

Keywords: 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 化粧品 cosmetics, 染毛用色素 hair colorant, セミパーマネントヘア カラー semipermanent hair dye preparation

はじめに

高齢化に伴う白髪人口の増加とヘアカラーリングの一般化・低年齢化により染毛用医薬部外品（ヘアカラー）及び化粧品（ヘアマニキュア、カラーリンス等）の種類や流通量が増加している¹⁾。

一般の化粧品に使用が許可されている色素(法定色素)は83種類であるが、毛髪用化粧品については、例外的に法定色素以外の色素も製造者の責任において使用することができる²⁾。日本ヘアカラー工業会ではCosmetic Ingredient Review(CIR)等により一定の安全性が保証された染毛用色素（平成16年4月現在25種類）について自主基準として「染毛料（化粧品）に配合できる色素リスト」を制定して

いる³⁾。

前報⁴⁾においてこれら25種類の染毛用色素のうち14種について分析法を検討し、市販化粧品の調査を行った。その後新たに6種の色素を入手したので、これらをあわせた分析法の改良を行い、更に市販毛髪用化粧品の分析を行ったので併せて報告する。

実験方法

1. 試薬

分析に用いた新規染毛用色素のうち本報で新たに入手したものの6種の構造をFig. 1に示す。なおHC黄5（以下HY5と略す）、2-アミノ-3-ニトロフェノール(同2ANP)、4-アミノ-3-

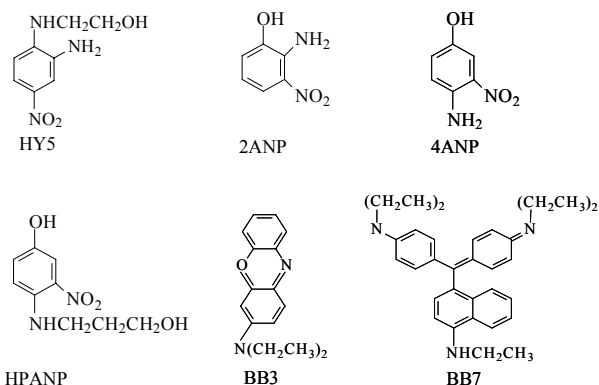


Fig. 1. Chemical Structures of Newly Obtained Hair Colorants

Table 1. International Nomenclature for Cosmetic Ingredients (INCI) Name of New Hair Colorants

INCI name	Abbreviation	Purity
HC Yellow No.5 ¹⁾	HY5	99%
2-amino-3-nitrophenol	2ANP	98%
4-amino-3-nitrophenol	4ANP	98%
4-hydroxypropylamino-3-nitrophenol	HPANP	99%
Basic Blue No.3 ¹⁾	BB3	~25%
Basic Blue No.7 ¹⁾	BB7	~98%

1) Not included in the hair colorant list of Japan Hair Color Industry Association.

* 東京都健康安全研究センター医薬品部微量分析研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073 Japan

ニトロフェノール(同 4ANP), 塩基性青 3(同 BB3)及び塩基性青 7(同 BB7)は関東化学(株)社製を購入し, 4-ヒドロキシプロピルアミノ-3-ニトロフェノール(同 HPANP)はクラリアントジャパン(株)社から供与を受けた. なおこれらのうち HY5, BB3 及びBB7はヘアカラー工業会の自主基準リストには収載されていない染毛用色素である.

これらの染毛用色素標準品の INCI 名, 略号及び純度を Table 1 に示した. その他の染毛用色素の構造, 略号及び INCI 名は前報⁴⁾に示したとおりである. その他の試薬は東京化成工業(株)又は和光純薬工業(株)製, 試薬特級品を用いた.

2. 試料

平成 15 年 12 月～平成 17 年 1 月に都内で販売されていた新規染毛用色素を含むヘアマニキュア, カラーシャンプーおよびカラーリンスを購入して, 試験に供した.

3. 標準溶液の調製

各染毛用色素標準品約 0.01 g を精密に量り, メタノール・水(1:1)に溶かし 10 mL として 1,000 µg/mL 標準原液とした. 各標準原液を 1.0 mL ずつとり, 混合して 50 µg/mL 混合標準溶液とし, 更に希釈して 25, 10, 5, 2.5, 1.0 µg/mL の混合標準溶液系列を作製した.

4. 添加回収試験用試験溶液の調製

染毛用色素及び法定色素を含有しない市販シャンプー及びリンス約 10 g を精密に量り, 各染毛用色素標準品約 10 mg ずつを精密に量り添加した. (株)キーエンス製かく拌・脱泡機 HM-500 を用いて混合し, 染毛用色素添加試作化粧品を作製した. 各試作化粧品約 1 g を精密に量りメタノール・水(1:1)に溶かし全量を 100 mL として添加回収用試験溶液とした.

5. 試験溶液の調製

各化粧品約 0.5～1.5 g を精密に量り, メタノール・水(1:1)を加えて溶解し, 全量を 20 mL とした. 必要に応じて一部を取り遠心分離(2,500 rpm, 5 分間)又はフィルターろ過を行い, 上澄液を得て試験溶液とした.

6. HPLC 条件

装置: 日本分光(株)製 LC-2000plus シリーズ, 検出器: フォトダイオードアレイ検出器 MD-2015, カラム: TSKgel-ODS 80TM(4.6 mm i.d.×150 mm, (株)東ソー), 移動相 A: 緩衝液/アセトニトリル(80:20), 移動相 B: 緩衝液/アセトニトリル(30:70), 緩衝液: 0.1% 1-デカンスルホン酸ナトリウム(SDeS)含有 0.01 mol/L リン酸緩衝液, pH2.5, グラジエント条件: Table 2, カラム温度: 40℃, 流速: 1 mL/min, 検出: 200～800 nm, 注入量: 10 µL.

結果及び考察

1. 分析条件の検討

前報⁴⁾では 14 種の染毛用色素を 2 グループに分けてそれぞれに分析条件を設定した. しかし, 市販製品には 2 グループのものが混在して配合されている場合が多い. そこで同一条件で分析できた方が望ましいと考え, 分析条件を再検討した. なお前報⁴⁾でイオンペアを添加したリン酸酸性の移動相で分離した塩基性の染毛用色素はメタノール・水だけのグラジエントでは十分な分離及びピーク形状が得られない事を確認した. そこでまず, 前報⁴⁾の移動相2を基本として分離条件の検討を行った. しかし, メタノールでは分離が十分得られない成分があり, アセトニトリルを用いて検討を続けた. また今回は分析する成分数が増加し, 互いの溶出位置が非常に近くなるため, pHの変化でピークの移動が起こり重なってしまうこ

Table 2. Stepwise HPLC Analytical Condition

Time (min)	Solution	
	A (%)	B (%)
0	100	0
6	100	0
6.1	88	12
15	88	12
15.1	66	34
28	66	34
28.1	0	100
40	0	100

Solution A : Buffer-Acetonitrile (80:20)

Solution B : Buffer-Acetonitrile (30:70)

Buffer : 0.01mol/L Phosphate buffer, 0.1%

Sodium 1-decanesulfonate, pH2.5

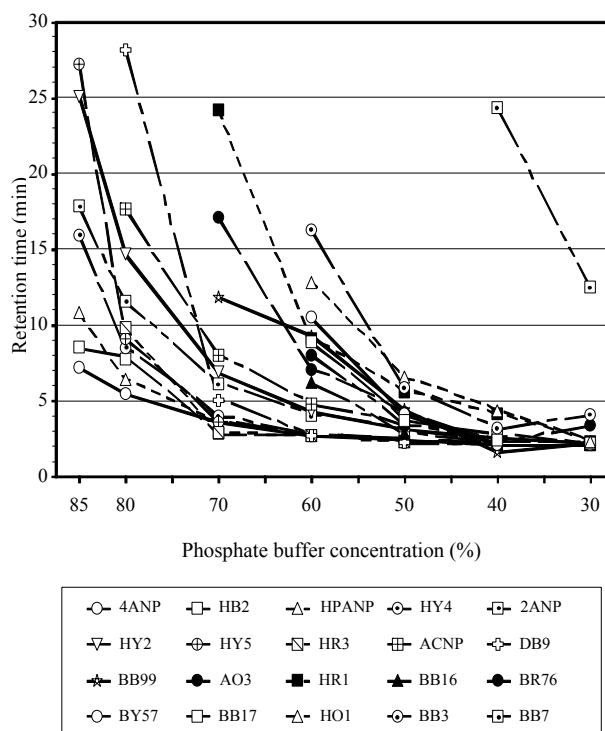


Fig. 2. Effect of the Buffer Concentration in Phosphate Buffer /Acetonitrile Solution System on Retention Time of Hair Colorants

とも考えられた。そこでピーク保持時間及び分離度の再現性を得るために移動相は pH2.5 のリン酸緩衝液とした。

緩衝液／アセトニトリル (85:15) から順次移動相の緩衝液濃度を変更して各色素の保持時間を測定したところ、Fig.2に示す結果が得られた。4ANP, HB2, HPANP, HY4, 2ANP, HY2及びHY5の7種については85%緩衝液で30分以内に検出可能であったが、HR3, ACNP, DB9, BB99, AO3及びHR1は80~70%, BB16, BR76, BY57, BB17, HO1及びBB3は40%緩衝液にする必要があった。また、BB7は緩衝液の比率が40%以下でなければ検出できなかった。これを基に緩衝液／アセトニトリル (80:20) を初期条件としてグラジエント条件を検討したが、リニアグラジエント条件では十分な分離が得られなかった。そこで、ステップワイズによる移動相の設定を試み緩衝液／アセトニトリル (80:20) 及び (30:70) を用いて条件を設定した。その結果、

Table 2に示した条件で20種の染毛用色素の分離が可能であった。

20種の染毛用色素を450 nm 及び600 nm で測定した場合のクロマトグラムをFig.3に示した。いずれの色素も2.5 ~ 50 ppm の濃度範囲で直線性が得られ、ピークの保持時間及び面積値の再現性についても良好であった(検量線直線性 r^2 : 0.9979~0.9999, 保持時間の変動係数 CV: 0.30~1.6%, 面積値変動係数 CV: 0.53~2.77%)。Fig.4に今回新たに分析に供した6種の染毛用色素のフォトダイオードアレイ検出器で検出した200 ~ 800 nm のスペクトルを示した。検出限界は測定機器ライブラリに登録した50 ppm 濃度時の各色素のスペクトルと比較し、一致した場合に検出可能濃度とした。その結果、色素によって異なるが0.5~2.5 ppm であった(Table 3)。

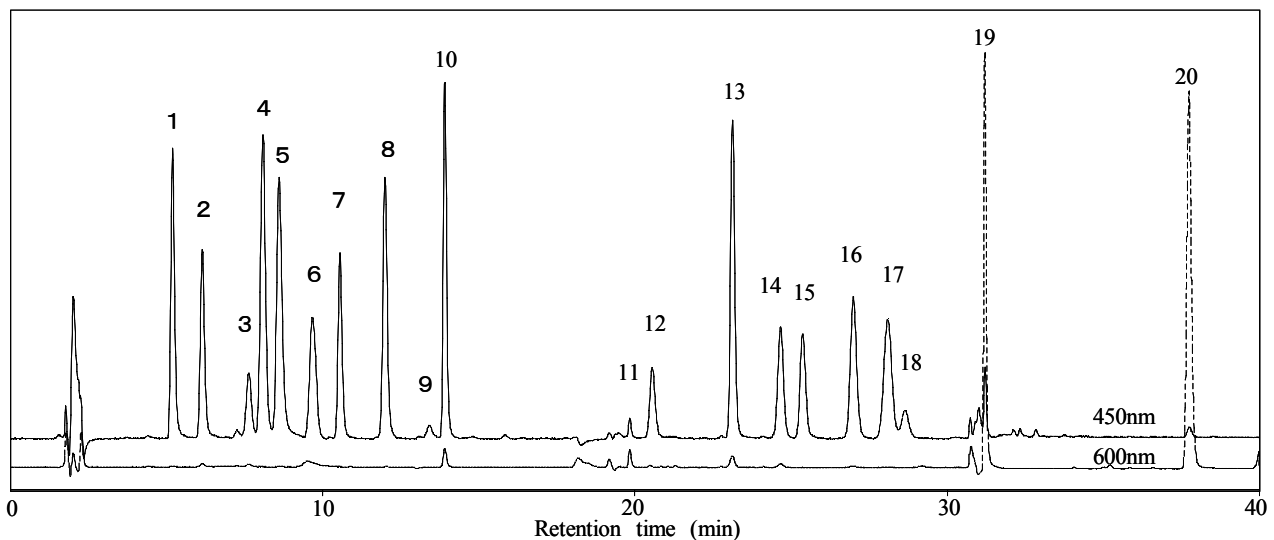


Fig. 3 Chromatogram of Hair Colorants

1 : 4ANP, 2 : HPANP, 3 : HB2, 4 : HY4, 5 : HY5, 6 : HR3, 7 : 2ANP, 8 : HY2, 9 : ACNP, 10 : DB9, 11 : BB99, 12 : AO3, 13 : BB16, 14 : HR1, 15 : BR76, 16 : BB17, 17 : HO1, 18 : BY57, 19 : BB3, 20 : BB7

Mobile phase : 0.01mol/L phosphate buffer, 0.1% sodium 1-decanesulfonate/Acetonitrile

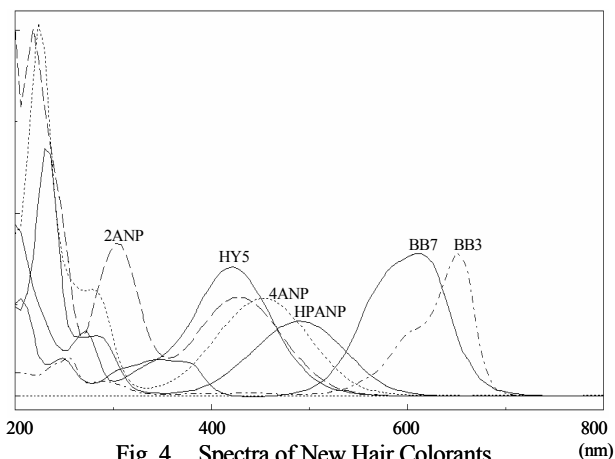


Fig. 4. Spectra of New Hair Colorants

Table 3. Detection Limit of 20 Hair Colorants

Detection limit		Detection limit	
Hair colorant	(ppm)	Hair colorant	(ppm)
4ANP	0.5	BB99	2.5
HPANP	0.5	AO3	0.5
HB2	0.5	BB16	1.0
HY4	1.0	HR1	0.5
HY5	0.5	BR76	1.0
HR3	0.5	BB17	2.5
2ANP	0.5	HO1	1.0
HY2	0.5	BY57	1.0
ACNP	0.5	BB3	0.5
DB9	0.5	BB7	0.25

3. 添加回収試験

市販のシャンプー及びリンスから作成した染毛用色素添加試作化粧品品の試験溶液について、上記 HPLC 条件で分析してその回収率を検討した。その結果 Table 4 に示したように、ほぼ全ての色素で良好な回収率が得られた。

4. 市販化粧品の分析

新規染毛用色素が成分表示されていた市販毛髪用化粧品 10 品目を購入し、本法により分析した。分析結果を Table 5 に、ヘアリンス 2 について得られたクロマトグラムを Fig.5 に示した。

表示された新規染毛用色素の種類は計 11 種類で、配合されている頻度は BB99, HB2, HY2, BY57 が多かった。また表示されていた染毛用色素のうち、日本ヘアカラー工業会のリストに収載されていない色素は HY5 と BB3 で、シャンプー 2 とヘアリンス 2 に表示されていた。分析の結果、シャンプー 2 から BB3 を検出したが、ヘアリンス 2 からは検出しなかった。HY5 はいずれからとも検出しなかった。Fig.5 に示したように今回分析に供した市販製品では、新規染毛用色素の検出にあたり妨害は見られなかった。

Table 4. Recovery Rate of Hair Colorants

Cosmetics Added hair colorant	Shampoo		Rinse	
	Recovery rate (%)	C.V. (%)	Recovery rate (%)	C.V. (%)
4ANP	103.0	1.3	101.2	1.1
HPANP	99.7	0.7	101.2	1.2
HB2	101.3	2.2	102.3	3.7
HY4	99.3	0.8	99.8	1.1
HY5	99.5	0.4	98.5	3.6
HR3	99.4	0.7	97.9	1.3
2ANP	98.8	1.0	99.4	2.7
HY2	99.4	0.6	98.8	1.9
ACNP	101.2	2.4	99.6	3.2
DB9	99.8	0.9	99.9	2.6
BB99	95.6	1.7	103.5	4.2
AO3	104.3	1.0	100.1	7.8
BB16	99.5	1.1	102.7	2.7
HR1	98.0	1.5	99.3	4.3
BR76	97.5	1.7	101.7	5.0
BB17	82.1	4.1	100.2	4.8
HO1	102.4	0.6	99.9	4.5
BY57	95.0	2.0	102.5	4.3
BB3	97.7	0.5	100.8	2.8
BB7	96.5	3.9	103.4	1.9

Added : 0.01%, n=5

Table 5. Analytical Results of New Hair Colorants Extracted from Commercial Hair Cosmetics

Cosmetics		Indication	Result
Shampoo	1	HY2, HB2, HPANP	HY2, HB2, HPANP
	2	HR3, HY5 ¹⁾ , HB2, BR76, BY57, BB16, BB3 ¹⁾ , BB99	BB3 ¹⁾ , BB99
Hair rinse	1	HR3, HY2, HB2, BR76, BY57, BB99	HR3, HB2, BR76, BY57, BB99
	2	HR3, HY2, HY5 ¹⁾ , HB2, BR76, BY57, BB16, BB3 ¹⁾ , BB99	HY2, HB2, BR76, BY57, BB99
Hair coloring preparation	1	BR76, BY57, BB16, BB17, BB99	BY57, BB16, BB99
	2	BY57, BB16, BB99	BY57, BB16, BB99
	3	HR3, HY4, HB2, BY57, BB16, BB99	HR3, HY4, HB2, BY57, BB16, BB99
	4	HY2, HB2, HPANP	HY2, HB2, HPANP
	5	HY2, HB2, HPANP	HY2, HB2, HPANP
	6	HY2, HB2, HPANP, BB99	HY2, HB2, HPANP, BB99

1) Not included in the hair colorant list of Japan Hair Color Industry Association.

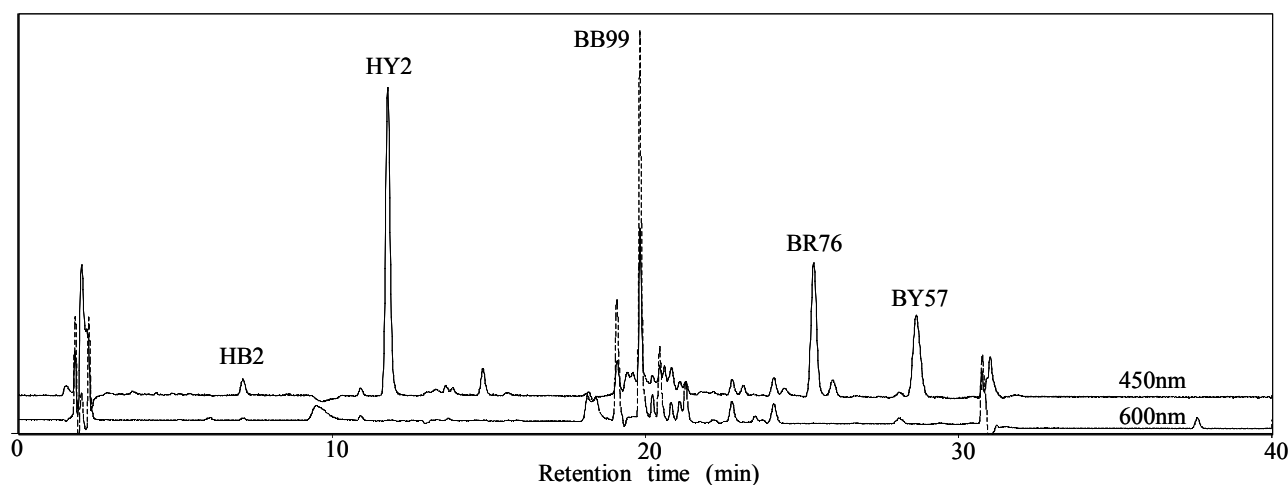


Fig. 5 Chromatogram of Commercial Hair Rinse (No.2)
Mobile phase : 0.01mol/L phosphate buffer, 0.1% sodium 1-decanesulfonate/Acetonitrile

各染毛用色素の配合量はシャンプーでは0.01～0.25% (平均0.08%) , リンスは0.003～0.17% (平均0.04%) , ヘアマニキュアは0.02～0.79% (平均0.31%) であった。これらの含量は, 新規染毛用色素を使用した染毛料の処方例⁵⁾として公開された含量とほぼ同様な値であった。

今回検討した市販毛髪用化粧品中には日本ヘアカラー工業会の自主基準に含まれていない染毛用色素(HY5及びBB3)を表示した製品(シャンプー2, ヘアリンス2)及び実際に含有する製品(シャンプー2, BB3)があった。染毛用色素として使用される色素の中には, 強いアレルギー性を持つことで知られる

p

-フェニレンジアミン(PPD)と同程度以上の感作能を有するものもあることが報告されており⁶⁾, 今回検討した色素では2ANP, 4ANP, BB99, BB17, HB2, HR3, HY2, HY4及びHY5はPPDより強い感作能を有するとされている。現在のところ, 我が国ではこれらの新規染毛用色素の危害事例はほとんど報告されていないが, 欧米では数種の染毛用色素について, アレルギーの症例が報告されている⁷⁻⁹⁾。今後これらの新規染毛用色素を配合した染毛料の使用量は更に増加することが想定されることから, その安全性には十分留意する必要があると考える。

ま と め

化粧品中の新規染毛料成分についてHPLCを用いた分析法の検討を行なった。その結果, 計20種の新規染毛用色素を40分以内で分析することが可能であった。各成分の検出

限界濃度は0.5～2.5 ppmであった。

本法を市販毛髪用製品の試験に適用したところ, 剤型に関わらず簡便な試験溶液の調製のみで効率的に新規染毛用色素の分析が可能であった。

文 献

- 1) 新井泰裕: 最新ヘアカラー技術, 3-4, 第1版, 2004, フレグランスジャーナル社, 東京
- 2) 化粧品基準: 平成12年9月29日, 厚生省告示第331号.
- 3) 日本ヘアカラー工業会ホームページ, <http://www.jhcia.org/>
- 4) 大貫奈穂美, 中村義昭, 森謙一郎, 他: 東京健安研 年報, 55, 79-84, 2005
- 5) 新井泰裕: 最新ヘアカラー技術, 81-85, 第1版, 2004, フレグランスジャーナル社, 東京
- 6) Sosted, H., Basketter, D.A., Estrada, E., *et al.*: *Contact Dermatitis*, 51, 241-254, 2004.
- 7) Blanco, R., de la Hoz, B., Sanchez-Fernandez, C., *et al.*: *Contact Dermatitis*, 39, 136, 1998.
- 8) de Groot, A. C., Weyland, J. W., : *Contact Dermatitis*, 23, 56-57, 1990.
- 9) Sosted, H., Menne, T., : *Contact Dermatitis*, 2(6), 317-319, 2005.