

化粧品に配合される新規頭髪用染料の分析法

大 貴 奈穂美^{*}, 中 村 義 昭^{*}, 森 謙一郎^{*}, 寺 島 潔^{*},
横 山 敏 郎^{*}, 伊 藤 弘 一^{*}

Analysis of New Hair Colorants of Cosmetics

Nahomi OHNUKI^{*}, Yoshiaki NAKAMURA^{*}, Ken'ichiro MORI^{*},
Kiyosi TERASHIMA^{*}, Toshiro YOKOYAMA^{*} and Kouichi ITOH^{*}

A rapid and simple analysis by HPLC was developed to determine the suitability of 14 new synthetic hair colorants for cosmetics.

The analytical procedure was as follows: The samples were diluted with 50% methanol and injected into HPLC. The HPLC conditions were as follows: HPLC column; ODS (4.6 mm i.d. × 150 mm), mobile phase 1; Methanol / H₂O linear gradient, mobile phase 2; 0.04% phosphoric acid including 0.5% sodium 1-decanesulfonate / Methanol(40:60), photodiode-array; 200-800 nm, column temperature; 40 °C. The 14 new hair colorants were separated for about 30 min and were identified from the absorbant spectra of each peak.

By using this method, new hair colorants used in 15 commercial cosmetics were determined to have good handling quality.

Keywords: 高速液体クロマトグラフィー HPLC, 化粧品 cosmetics, 頭髪用染料 hair colorant, セミパーマメントヘアカラー semipermanent hair dye preparation, 分析 analysis

はじめに

平成 13 年 4 月に薬事法の一部改正に伴い化粧品の規制が緩和され、従来の化粧品品質基準に代わり化粧品基準¹⁾が設定された。これにより配合禁止・配合制限成分リスト(ネガティブリスト)及び配合許可成分リスト(ポジティブリスト)に記載された成分以外の成分は各メーカーが自己責任のもと化粧品に自由に配合できることとなった。

この規制緩和に伴い、日本ヘアカラー工業会はヘアマニキュア、カラーシャンプー及びカラーリンス等の頭髪用化粧品に配合可能な頭髪用染料の自主基準として「染毛料(化粧品)に配合できる色素リスト」を平成 13 年 3 月 30 日付で制定し 9 品目の新規頭髪用染料を収載した²⁾。このリストはその後順次追加収載が行われ³⁾、平成 16 年 4 月現在 25 種の有機合成色素が収載されている⁴⁾。これらの色素は欧州化粧品工業会の「ヘアカラーとして使用される染料リスト」に含まれるセミパーマメントヘアカラーで欧米での使用実績がある。その安全性については Cosmetic Ingredient Review Expert Panel (CIR)による安全性評価の結果⁵⁾に基づくものと日本ヘアカラー工業会に安全性資料が供託または安全性資料を登録申請者が保持することを保証する内

本自主基準の設定により、我が国で製造されるヘアマニキュア、カラーシャンプー及びカラーリンス等頭髪用化粧品に新たな頭髪用染料が配合されるとともに、これらの成分が含有されているにもかかわらず表示されていない輸入製品等が流通する可能性が増大した。

今回これらの新規頭髪用染料のうち 14 種を入手したので HPLC による分析方法の確立を試みた。また、これらの頭髪用染料を配合した市販化粧品の分析を行ったので報告する。

方 法

1. 試薬 分析に用いた新規頭髪用染料の構造を Fig.1 に示す。なお酸性橙 3(以下 AO3 と略す)、HC 赤 3(同 HR3)、HC 黄 4(同 HY4)、HC 橙 1(同 HO1)、HC 青 2(同 HB2)及び分散黒 9(同 DB9)は Huwell Chemicals 製、HC 赤 1(同 HR1)及び HC 黄 2(同 HY2)は Jos. H. Lowenstein & Sons. Inc 製、2-アミノ-6-クロロ-4-ニトロフェノール(同 ACNP)は Aldrich 製を用い、塩基性赤 76(同 BR76)、塩基性黄 57(同 BY57)、塩基性茶 16(同 BB16)、塩基性茶 17(同 BB17)及び塩基性青 99(同 BB99)は大阪化成工業(株)から供与を

* 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

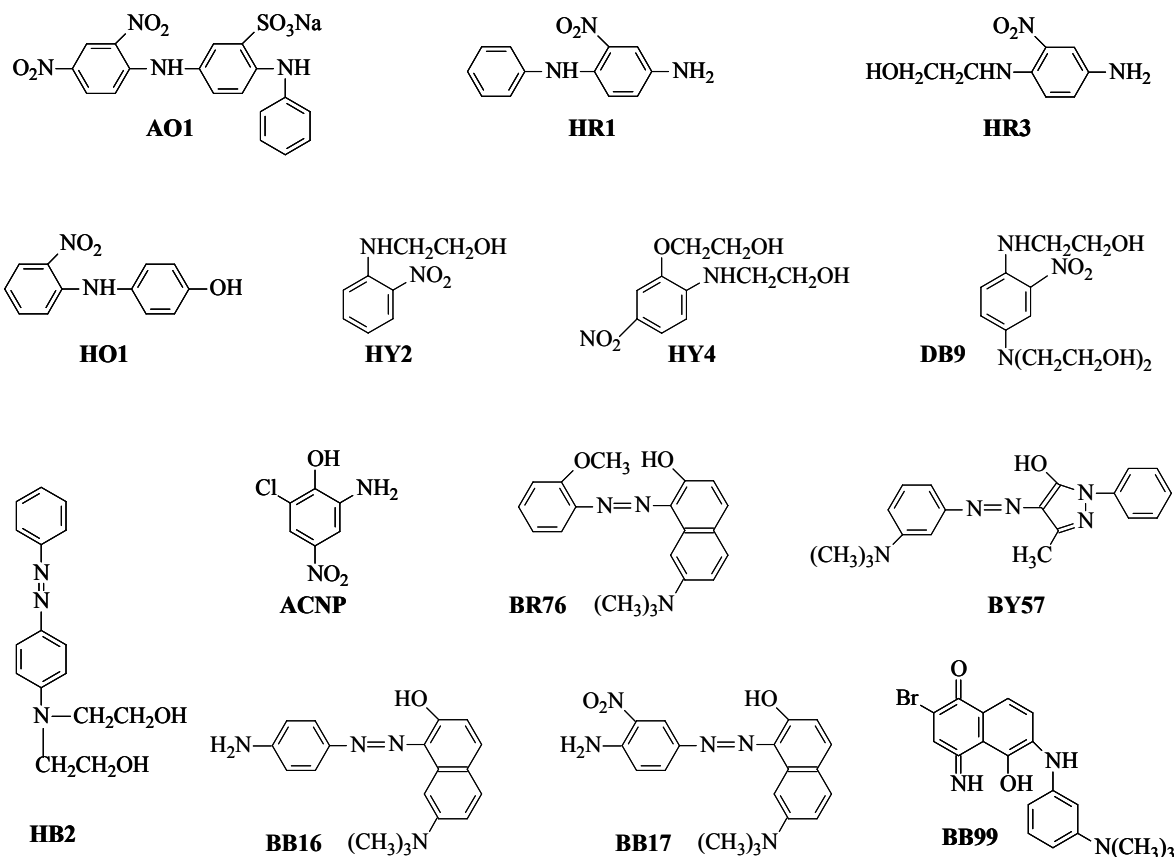


Fig.1. Structure of New Hair Colorants

Table1. INCI Name of New Hair Colorants

INCI name	Abbreviation	Analytical Wavelength (nm)
Acid Orange No.3	AO3	360
HC Red No.1	HR1	500
HC Red No.3	HR3	500
HC Orange No.1	HO1	435
HC Yellow No.2	HY2	440
HC Yellow No.4	HY4	420
HC Blue No.2	HB2	550
Disperse Black No.9	DB9	455
2-amino-6-chloro-4-nitrophenol	ACNP	320
Basic red No.76	BR76	505
Basic Yellow No.57	BY57	380
Basic Brown No.16	BB16	480
Basic Brown No.17	BB17	450
Basic Blue No.99	BB99	610

INCI: International Nomenclature for Cosmetic Ingredients

受けた。これらの頭髪用染料標準品の純度は97~100%であった。またそのINCI名をTable1.に示した。

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16年1月に都内で販売

されていた新規頭髪用染料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 各頭髪用染料標準品約0.01gを精密に量り, 50%メタノールに溶かし10mLとして1,000 μg/mL標準原液とした。HR1, HY2, AO3, HR3, HY4, HO1, HB2及びDB9の標準原液を1.0mLずつとり, メタノールで10mLとして100 μg/mL混合標準溶液とし, 更に希釈して50, 25 μg/mLの混合標準溶液系を作製した。ACNP, BR76, BB16, BB17及びBB99についても同様に混合標準溶液系を作製した。

4. 添加回収試験用試料溶液の調製 新規頭髪用染料を含有しない市販シャンプー及びリンス約10gを精密に量り, 各頭髪用染料標準品約10mg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, 頭髪用染料添加試作化粧品を作成した。各試作化粧品約1gを精密に量りメタノールに溶かし10mLとして試料とした。

5. 試験溶液の調製 10mLの共栓付試験管に試料約0.5gを精密に量り, メタノール/水(1:1)を加えて溶解し全量を10mLとする。必要に応じて遠心分離(2,500rpm, 5分間)を行い上澄液を得た。

Table 2. Linear Gradient Condition of Mobile Phase1

Time(min)	A(%)	B(%)
0	100	0
10	100	0
20	0	100
30	0	100
30.1	100	0

A: 35% Methanol

B: 80% Methanol

6. HPLC 条件 装置：日本分光(株)製ガリパーシリーズ，検出器：フォトダイオードアレイ検出器，カラム：TSKgel-ODS80TM (4.6 mm i.d. × 150 mm, (株)東ソー)，移動相 1：A 液；35%メタノール，B 液；80%メタノール，グラジエント条件：Table 2.，移動相 2：0.5% 1-デカンスルホン酸ナトリウム(SDeS)含有 0.04%リン酸・メタノール(40:60)，カラム温度：40℃，流速：1 mL/min，検出：200~800 nm，注入量：10 μL.

結果および考察

1. 分析条件の検討 1) リニアグラジエント条件 HR1, HY2, AO3, HR3, HY4, HO1, HB2 及び DB9 についてカラムに逆相系の TSKgel-ODS80TM を用い，カラム温度 40℃，流速 1 mL/min の条件下でメタノール/水系移動相による最適な色素分析条件について検討した．その結果を Fig.2 に示す．まず，メタノール/水(30:70)の混液を移動相として検討したところ HR3, HY2, HB2, HY4 及び DB9 は 30 分以内に分離したが，HR1, HO1 及び AO3 は 30 分以内に溶出しなかった．メタノール含有量の増加に従って各成分の保持時間は短くなり，メタノール 50%以上にすると AO3, HR1 及び HO1 は 30 分以内に溶出した．しかし，それ以外の色素は保持時間が短くなり分離ができないものがあった．そこで，全ての色素を比較的短時間に溶出させるためグラジエントを行うこととした．すなわち，35%メタノールで 10 分間保持した後，20 分までにメタノールを 80%に増加し，そのまま 10 分間保持することで 8 種の色素が 30 分以内に分離溶出された．この移動相を移動相 1 とした．

2) 単一条件 ACNP, BR76, BY57, BB16, BB17 及び BB99 については水/メタノールの単一条件及び移動相 1 によるリニアグラジエント条件では全てのピークが分離しなかった．そこで移動相にリン酸を加え 0.04%リン酸/メタノール(4:6)としたところで分離がよくなる傾向が見られたものの十分ではなかった．そこでさらにイオン対を添加して分離及びピーク形状の改良を図った．

0.04%リン酸/メタノール(4:6)にそれぞれ 0.5%になるようにヘキサンスルホン酸ナトリウム(SHS)，オクタンスルホン酸ナトリウム(SOS)及びデカンスルホン酸ナトリウム(SDeS)を添加したところ Fig. 3 に示したように SDeS 添加でピーク形状の改善と十分な分離が得られた．この移

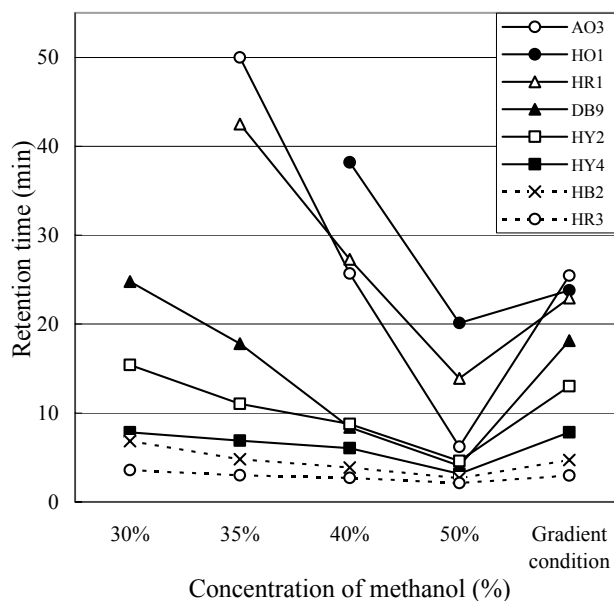
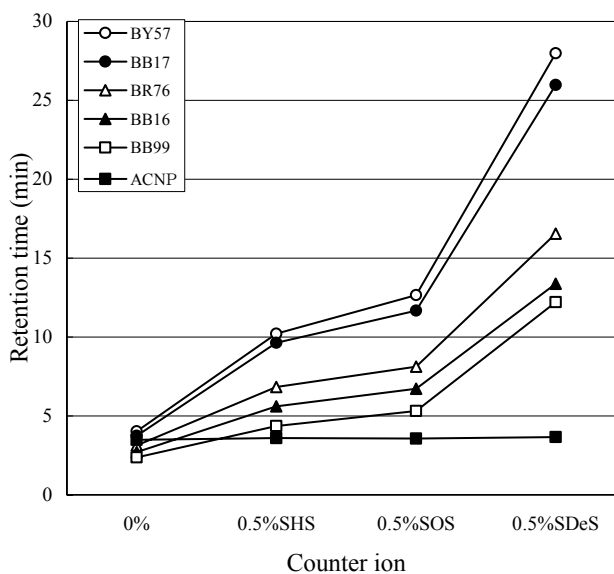
Fig.2. Effect of Methanol Concentration in Methanol/H₂O Solution System on Retention Time of New Hair Colorants

Fig.3. Effect of Counter Ions in 0.04% Phosphoric Acid/Methanol (40:60) on Retention Time of New Hair Colorants

動相を移動相 2 とした．

1), 2)の条件で得られた各頭髪用染料のクロマトグラムを Fig.4 に，吸収スペクトルを Fig.5-1 及び 5-2 に示す．

この条件で 25~200 μg/mL の検量線を作成して直線性を検討したところ，すべて R=0.9996 以上の直線性が得られた(n=5)．また，保持時間の安定性は cv 値 1.3%以下と良好であった．なお定量用波長は AO3 は 358nm，ACNP は 320nm，BY57 は 382nm とし，そのほかの染料については各染料の可視部極大吸収波長とした(Table 1)．

検出限界は 100 μg/mL 標準溶液で得られたスペクトルとの一致度を比較したところ，HY4, HO1, AO3 及び ACNP

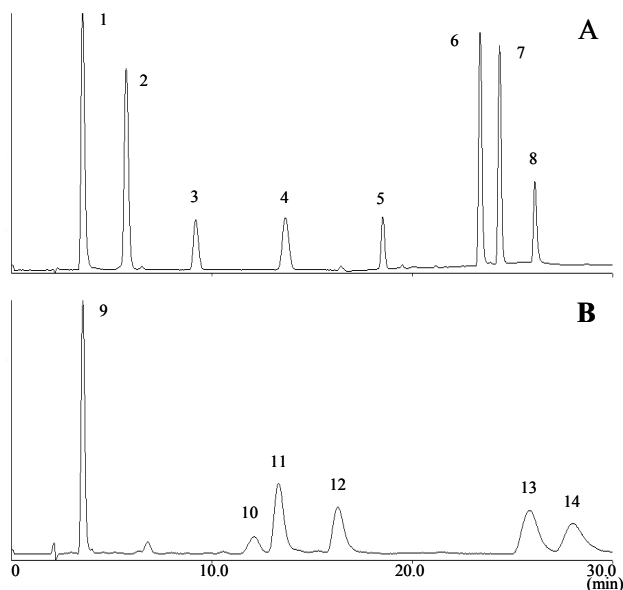


Fig.4. Chromatogram of New Hair Colorants
 1:HR3, 2:HB2, 3:HY4, 4:HY2, 5:DB9, 6:HR1, 7:HO1,
 8:AO3, 9:ACNP, 10:BB99, 11:BB16, 12:BR76, 13:BB17,
 14:BY57

A: Mobile Phase 1; MeOH/H₂O gradient system (Table 2)

B: Mobile Phase 2; 0.04% phosphoric acid, 0.5% sodium 1-decanesulfonate/Methanol (40:60)

Detection: 254nm

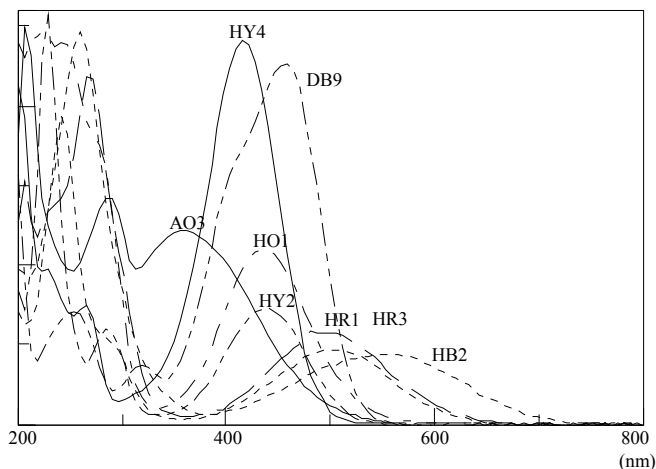


Fig.5-1. Spectrums of New Hair Colorants (1)

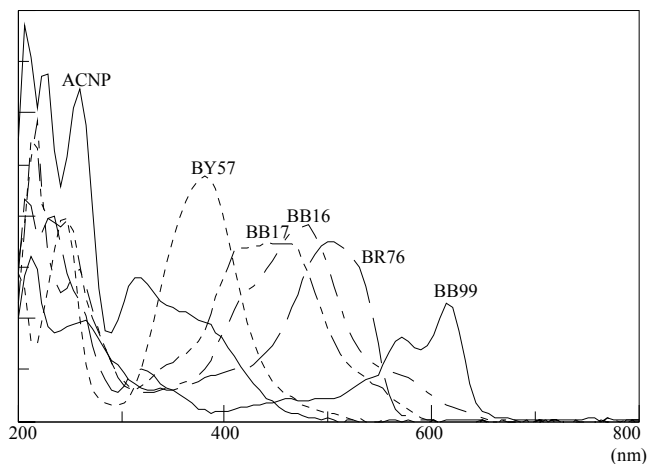


Fig.5-2. Spectrums of New Hair Colorants (2)

Table 3. Recoveries of New Hair Colorant

Cosmetics	Added hair colorant	Recovery rate (%)	Coefficient of Variation
Shampoo	HR3	97.4	2.2
	HB2	95.6	3.3
	HY4	95.3	2.2
	HY2	95.4	0.6
	DB9	95.4	0.9
	HR1	98.3	3.3
	HO1	101.7	1.4
	AO3	101.7	3.3
	ACNP	99.7	0.6
	BB16	100.4	2.3
Hair rinse	BR76	101.0	2.7
	BB17	98.5	1.9
	BY57	99.2	1.1
	BB99	100.1	2.2
	HR3	99.1	1.4
	HB2	100.3	2.0
	HY4	100.0	1.5
	HY2	98.1	1.2
	DB9	99.9	1.8
	HR1	99.1	2.1
HO1	100.1	2.7	
AO3	96.0	2.9	
ACNP	100.4	2.9	
BB16	100.5	1.1	
BR76	99.9	2.0	
BB17	103.0	1.8	
BY57	100.1	1.5	
BB99	101.3	1.0	

added : 0.1%, n=5

は 2 $\mu\text{g/mL}$, HB2, HY4, HY2, DB9, HR1 は 5 $\mu\text{g/mL}$, BB16, BB17 及び BR76 は 10 $\mu\text{g/mL}$, BY57 及び BB99 は 25 $\mu\text{g/mL}$ であった。

2. 前処理法の検討 今回検討に用いた頭髪用染料は構造的に酸化染毛剤に類似した成分が多く、酸化による分解を受けやすいと考えられる。そこで空気酸化を防ぐために酸化防止剤を添加する必要があるか否かについて検討した。0.1%標準原液各 1 mL を取りメタノールを加えて 10 mL とした後、酸化防止剤として亜硫酸水素ナトリウム 0.5 g の添加及び無添加溶液を作成した。作成直後と 5 日後に HPLC による分析を行った。その結果、亜硫酸水素ナトリウム添加・無添加にかかわらず各頭髪用染料のピーク形状及び面積値に変化は認められなかった。これにより今回検討した頭髪用染料では酸化防止剤を添加する必要はないと考えられる。

3. 添加回収試験 今回検討した新規頭髪用染料はヘアマニキュア又はシャンプー、リンスに配合してカラーシャンプー又はカラーリンス(カラートリートメント)として販売されることが予想される。また、欧米におけるそれぞれの配合上限量は 0.5~3.0%とされている⁵⁾。そこで、市販のシャンプー及びリンスにそれぞれの頭髪用染料を 0.1% になるように添加して回収試験を試みた。添加回収

Table 4. Analytical Results of New Hair Colorants Extracted from Commercial Cosmetics

Cosmetics	Country of origin	Indication	Result
Shampoo	1	Japan	HB2, HY2
	2	Japan	BY57, BR76, BB16, BB99, HY5, HR3, HB2
	3	Malaysia	hennna BB16, BB99, BR76, BY57
Hair rinse	1	Japan	HB2, HR3, HY2, BR76, BB99, BY57
	2	Japan	BY57, BR76, BB16, BB99, HY5, HR3, HB2, HY2
	3	Japan	hennna BY57, BR76, BB16, BB17, BB99
	4	Spain	hennna BB99, BR76
	5	Malaysia	hennna BB17, BB16, BB99, BR76, BY57
Hair coloring preparation	1	Japan	hennna HB2, HY2
	2	Japan	hennna HB2, HY2
	3	Japan	hennna HB2, HY2, BB99
	4	Malaysia	hennna BB16, BB99, BR76, BY57
	5	Malaysia	hennna BB16, BB99, BR76, BY57
	6	Malaysia	hennna BB17, BB16, BB99, BR76, BY57
	7	Brazil	hennna HR1, HY2, HB2

1) Un-indicated hair colorant was detected.

試験の結果を Table 3 に示す。シャンプーでは回収率は 95.3 ~ 101.7 %，変動係数 0.6 ~ 3.3 %，リンスでは回収率は 96.0 ~ 103.0 %，変動係数 1.2 ~ 2.9 % とほぼ満足できる結果であった。

4. 市販化粧品の分析 新規頭髪用染料が表示に記載されている市販化粧品 15 品目（日本製 8 品目，輸入品 7 品目）を購入して分析に供し，その結果を Table 4 に示した。15 品目中 11 品目（日本製 4 品目，輸入品 7 品目）は，ヘナ葉エキスを配合されたものに新規頭髪用染料が加えられたものであった。本新規頭髪用染料はヘナによる染毛に色調の幅を広げることを目的として配合されることが多いと考えられた。

分析の結果，表示に記載された頭髪用染料の全てを検出した製品が 9 品目，表示に記載された頭髪用染料の一部を検出した製品が 3 品目，表示に記載されていない頭髪用染料を検出した製品が 3 品目であった。このうち成分表示に記載された頭髪用染料の一部のみを検出した製品については，検出しない染料の配合量が検出限界以下であったと考えられた。成分表示に記載されていない頭髪用染料が検出された製品は全て輸入化粧品であった。

今回の市販品調査より，新規頭髪用染料を含む毛髪用化粧品では輸入品の割合が高率であることが判明した。諸外国では日本ヘアカラー工業会の自主基準に収載されていない頭髪用染料も使用されている。また，自主基準に収載された染毛料による皮膚炎が報告されている⁶⁾。今後ヘアカラー工業会の自主基準に収載された全ての頭髪用染料及び欧米で使用されている染毛料の分析法を確立し市販品の試験に用いる予定である。

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った。その結果，2 種類の測定法を用いて計 14 種の新規染毛料を 25 ~ 200 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で 30 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 2 ~ 25 $\mu\text{g/mL}$ ，保持時間の変動係数は 1.3 % 以下であった。

本法を市販製品の試験に適用したところ，剤型に関わらず簡便な試料調製のみで効率的に新規染毛成分分析が可能であった。市販品には表示に記載されていない染毛料が含まれている製品もあった。

文献

- 1) 化粧品基準：平成 12 年 9 月 29 日，厚生省告示第 331 号。
- 2) 日本ヘアカラー工業会自主基準「染毛料（化粧品）に配合できる色素リスト」について：FRAGRANCE JOURNAL, 1, 13-14, 2003.
- 3) 染毛料（化粧品）に配合できる色素の追加について：FRAGRANCE JOURNAL, 5, 13, 2003.
- 4) 染毛料（化粧品）に配合できる色素リスト：日本ヘアカラー工業会ホームページ，
<http://www.jhcia.org/haircolor/coloring/index.html>
- 5) 三田康蔵：FRAGRANCE JOURNAL, 8, 16-27, 2001.
- 6) Le Coz, C-J., Kuhne, S., and Engel, F. : CONTACT DERMATITIS, 49, 103, 2003.