
資料

薄層クロマトグラフ法による酸化染料の検出限界

熊坂謙一, 大森清美, 小島尚, 土井佳代,
佐藤修二

The Detection Limits of Oxidative Dyes by Thin Layer Chromatography

Kenichi KUMASAKA, Kiyomi OMORI,
Takashi KOJIMA, Kayo DOI, Shuji SATO

医薬部外品及び医薬品等の一部の製造(輸入)承認は都道府県知事に委譲されている。衛生研究所薬事毒性科では県薬務課の依頼に基づき製造(輸入)承認申請書の規格及び試験方法の審査を担当している。近年の当科における審査品目の大半は医薬部外品に該当する染毛剤である。これはいわゆる“おしゃれ染め”的流行を反映しているものと思われる。

染毛剤には一時染毛剤、半永久染毛剤及び永久染毛剤がある。永久染毛剤は、毛髪への染色力も強く、一時染毛剤及び半永久染毛剤より持続性もあることから、染毛剤の中では広く使用されている。この永久染毛剤には1剤形と2剤形がある。通常、液体またはクリーム状の製品である2剤形は、有効成分である酸化染料及びアンモニア水などのアルカリ剤を含む第1液と酸化剤として数パーセントの過酸化水素を含む第2液から成り、使用時に混合し酸化染料を酸化させて毛髪を染毛するものである。第1液に含まれる酸化染料は主に芳香族アミノ化合物であり、パラフェニレンジアミンやパラアミノフェノール等多くの種類がある。これらは皮膚アレルギーを引き起こす可能性もあり、染毛剤等医薬部外品において「表

示成分」に規定されている成分でもある。また、平成6年3月15日付厚生省薬務局審査課長通知により、染毛剤の製造(輸入)承認申請において有効成分である酸化染料の確認試験等の設定が必須となっており、その規格及び試験方法を適切に設定することが重要となる。

酸化染料の分析方法として薄層クロマトグラフ法が衛生試験法・注解¹⁾に収載されている。その他、ガスクロマトグラフ法²⁾及び高速液体クロマトグラフ法³⁾等が報告されている。薄層クロマトグラフ法による分析試験は、他の手法に比べて比較的簡便であるため汎用されている。

本来であれば、すべての申請書の試験方法について実地試験を行い、その妥当性について検証する必要がある。しかしながら、審査件数は年間100件以上ありその業務量、及び条例により審査期間が定められていることから、迅速に審査を行うため、大半は机上での書類審査となる。その過程において、薄層クロマトグラフ法による染毛剤中の酸化染料類の確認試験では、試験成績書に添付されている試験時の薄層板写真の鮮明度合い及びその信憑性が問題となる場合がある。特に配合量の少ない酸化染料が含まれている場合、実際には確認されていても添付されている写真では確認しづらいこともある。または、低濃度であっても予想以上に鮮明に確認されることもあり、申請された試験方法と実際に行われた試験方法が異なる可能性も考えられる。このような場合、申請された試験方法及び添付された試験成績書の妥当性について判断する根拠、即ち、薄層クロマトグラフ法により検出できる最低限量の酸化染料を予め検討しておくことにより、試験方法上の指摘事項について速やかに判断することが可能となり、また、申請者への疑義照会の回数を減らすことにより、審査期間の短縮及び業務の効率化にもつながる。

そこで、薄層クロマトグラフ法による各酸化染料のおよその検出限界量と試験上の問題点について検討した。

試験方法は衛生試験法・注解¹⁾を参考とした。本検討では製品に汎用されている酸化染料14種類を試験に用いた。その詳細を表1に記す。試験溶液の調製は、各酸化染料約0.05gを精密に量り、2-プロパノール・水・アンモニア水混液(9:3:1)を加えて溶かし正確に100mLとし0.5mg/mLの原液を調製した。この原液をさらに希釈し0.1mg/mLの溶液を調製し、以下希釈し0.01mg/mL毎の溶液を調製した。この希釈液5mLに対して亜硫酸水素ナトリウム0.1gを加えて混和し、その上清を試験溶液とした。試験溶液は調製後直ちにその2μLを薄層板にスポットした。なお、薄層板は蛍光剤入りシリカゲル薄

表1 試験に用いた酸化染料標準品

酸化染料	規格	メーカー	純度
パラフェニレンジアミン	—	ALDRICH	99%以上
パラアミノフェノール	1級	和光純薬	98.0%以上 ¹⁾
メタアミノフェノール	1級	和光純薬	99.0%以上 ²⁾
オルトアミノフェノール	—	和光純薬	97%以上
5-アミノオルトクレゾール	1級	和光純薬	97.0%以上
4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン	—	ACROS	98%
塩酸メタフェニレンジアミン	特級	東京化成	99.0%以上
2-ニトロ-1,4-フェニレンジアミン	—	東京化成	94%以上
レゾルシン（レゾルシノール）	特級	和光純薬	99.0%以上
α -ナフトール	特級	和光純薬	99.0%以上
2,6-ジアミノピリジン	1級	和光純薬	98.0%以上
ピクラミン酸	特級	東京化成	98%以上
硫酸トルエン-2,5-ジアミン	1級	東京化成	98%以上
塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール	外原規 ³⁾	— ⁴⁾	95%以上

1)薄層クロマトグラフ用パラアミノフェノール：医薬部外品原料規格、試薬・試液に従い再結晶を行った。

2)薄層クロマトグラフ用メタアミノフェノール：医薬部外品原料規格、試薬・試液に従い再結晶を行った。

3)医薬部外品原料規格適合品

4)インターナショナル・トイレツリース株式会社より供与された。

層板(Silica Gel 60 F₂₅₄, MERCK)を用いた。展開溶媒としてクロロホルム・酢酸エチル・エタノール混液(7:2:1)または2-プロパノール・酢酸・水混液(8:1:1)を用い、各展開溶媒で約10cm 展開後薄層板を風乾する。酸化染料のスポットの検出は、まず紫外線254nm 及び366nm 照射により確認する。さらに0.5% パラジメチルアミノベンズアルデヒド10%塩酸溶液(発色液)を噴霧し、レゾルシン及び α -ナフトールは噴霧3時間後、他の酸化染料は30分後に蛍光灯照射下でスポットの Rf 値及びその色調を確認した。なお検出限界の判定は、試験を同様に3回繰り返して行い、いずれの試験でも適切な Rf 値及び色調を持つスポットが確認された最大量を検出限界とした。

各酸化染料のスポットの Rf 値、色調及びおおよその検出限界を表2に示す。薄層クロマトグラフ法においてスポットの Rf 値は約0.2~0.8の範囲内に入るようにすべきとされていることから⁴⁾、展開溶媒は2,6-ジアミノピリジン、ピクラミン酸、硫酸トルエン-2,5-ジアミン及び塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノールでは2-プロパノール・酢酸・水混液(8:1:1)とし、他の酸化染料ではクロロホルム・酢酸エチル・エタノール混液(7:2:1)とした。また、紫外線照射のみで発色液より高感度あるいは同程度の検出限界を持つ場合は併せて記載した。

表2に示したように、酸化染料はスポットした絶対量として最低限約80~140ng 程度あれば発色液噴霧により

検出されることが明らかとなった。また、この時試験間で約±20ng 程度の変動が見られた。 α -ナフトール、硫酸トルエン-2,5-ジアミン及びピクラミン酸は検出感度が多少劣る結果となった。また、酸化染料のスポットの発色に関して、ほとんどの酸化染料は発色液噴霧後30分以上室温放置すれば充分発色したが、 α -ナフトール及びレゾルシンは他の酸化染料と比較して充分な発色に長時間を要した。ここでは詳細な検討はしていないものの、およそ3時間以上室温放置すればその後の発色程度は変化しなかったため、検出確認を3時間後と設定した。 α -ナフトール及びレゾルシンの検出に問題が生じる原因として、これらは他の酸化染料とは異なりフェノール性化合物であることから、検出に使用した発色液がおそらくこのようなフェノール性化合物に対して感度が劣るためであり、塩化鉄が含まれる他の発色液を用いれば高感度かつ短時間に検出できるものと予想される⁵⁾。しかし実際の製品では、配合される酸化染料の大半はフェニレンジアミン類及びアミノフェノール類等であり、フェノール性化合物はレゾルシンまたは α -ナフトールのいずれかが配合されていることが多いため、製品の確認試験では本発色液を用いる方が簡便である。よって、本実験条件において、 α -ナフトールを含む染毛剤の確認試験を設定する場合は、感度を増すために薄層板での展開に影響を及ぼさない範囲でスポット量を多くする必要があ

表2 各酸化染料の検出限界

酸化染料類	Rf 値	発色液 ¹⁾		紫外線254nm 照射		紫外線366nm 照射	
		色調	検出限界(ng)	色調	検出限界(ng)	色調	検出限界(ng)
展開溶媒①²⁾							
パラフェニレンジアミン	0.18	黄赤色	80	黒色(吸収)	60	黄色蛍光	40
パラアミノフェノール	0.28	黄色	120	黒色(吸収)	120	>200	>200
メタアミノフェノール	0.35	黄色	40	>200	>200	>200	>200
オルトアミノフェノール	0.38	黄赤色	60	>200	>200	>200	>200
5-アミノオルトクレゾール	0.30	黄色	80	黒色(吸収)	60	>200	>200
4-ニトロ-1,2-フェニレンジアミン	0.31	黄色	80	黒色(吸収)	80	黒色(吸収)	100
メタフェニレンジアミン	0.18	黄色	40	>200	>200	淡黄色蛍光	200
2-ニトロ-1,4-フェニレンジアミン	0.37	帶赤黄色	100	黒色(吸収)	100	黒色(吸収)	200
レゾルシン	0.45	紫色	80	黒色(吸収)	80	黒色(吸収)	80
α -ナフトール	0.57	紫色	140	黒色(吸収)	100	>200	>200
展開溶媒②³⁾							
2,6-ジアミノピリジン	0.62	青紫色	80	青色蛍光	80	青色蛍光	<20
ピクラミン酸	0.82	黄赤色	140	黒色(吸収)	100	黒色(吸収)	120
硫酸トルエン-2,5-ジアミン	0.55	黄赤色	140	黒色(吸収)	80	赤色	40
塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール	0.48	黄色	80	黒色(吸収)	100	黄緑色蛍光	60

1) 発色液は0.5% p-ジメチルアミノベンズアルデヒド10%塩酸溶液を用いた。

2) 展開溶媒①: クロロホルム、酢酸エチル及びエタノール混液(7:2:1)

3) 展開溶媒②: 2-プロパノール、酢酸及び水混液(8:1:1)

り、また、レゾルシン、 α -ナフトール等フェノール系化合物を含む場合は、発色液噴霧後検出確認までの時間を長くするか、場合によっては衛生試験法・注解に記載されているように60°C10分間加温し発色を促進する等の操作が必要である。しかし、検出確認までの時間を長くしすぎると、フェニレンジアミン類、アミノフェノール類等の他の酸化染料のスポットの発色が徐々に退色してしまうため、60°C10分間加温による発色が確実であった。

また、発色液による検出よりも紫外線照射のみで高感度に検出されるものがあった。特に2,6-ジアミノピリジン及び硫酸トルエン-2,5-ジアミンは紫外線366nm 照射によりそれぞれ青色蛍光、赤色の特異的なスポットを呈して高感度に確認されることから、これらの酸化染料を迅速かつ高感度に検出する方法として有用であると考えられた。他にも検出感度は同等であるが塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノールのスポットは特異的な黄緑色蛍光を呈していた。また、 α ナフトール及びピクラミン酸は紫外線254nm 照射により黒い吸収を示し、発色液による検出よりも高感度に検出されていた。 α ナフトールは発色液の場合、検出感度も比較的悪く、また、検出までに時間がかかることから、紫外線照射による検出は有効であると考えられた。しかしながら、紫外線254nm 照射の場合、酸化染料以外にも黒い吸収を呈する物質が

多いことから、紫外線254nm 照射が有用であるか否かは、製品に配合される成分により異なると考えられる。

パラアミノフェノールの検出感度も他の酸化染料に比べて多少劣る傾向にあった。試験溶液調製後時間が経過したものをスポットして展開を行った場合、分解物と思われる、原点に残る成分が増えることから、経時変化による分解がおきたと考えられる。そのため、試料溶液調製後速やかに試験を行うことが必要であると考えられた。

また、発色液は調製後1週間以上経過したものを使用した場合、調製直後のものに比べ発色が悪くなる傾向が見られた。よって発色液は数日内に使用する、あるいは用時調製するのが望ましいと思われた。

製造(輸入)承認申請書「規格及び試験方法」に規定される「確認試験」は、製品に有効成分が確実に含まれていることを確認する重要な試験項目である。よって、今回示した薄層クロマトグラフ法による酸化染料の検出限界及び試験上の問題点等さらに情報を蓄積し、製造(輸入)承認書審査業務においてその妥当性を的確かつ迅速に検証する上での判断基準として活用し、更に申請者が試験方法を適切に設定する際の有用な参考資料になるとを考えている。

謝辞

本実験にご協力頂きました麻生順子氏に感謝申し上げます。また、酸化染料標準品「塩酸2,4-ジアミノフェノキシエタノール」はインターナショナル・トイレツリース株式会社より御供与頂きました。お礼申し上げます。

(平成14年7月24日受理)

参考文献

- 1) 日本薬学会編：衛生試験法・注解2000, 653-654, 金原出版, 東京(2000)
- 2) Tokuda, H. Kimura, Y. and Takano, S :

Determination of dye intermediates in oxidative hair dyes by fused-silica capillary gas chromatography, J. Chromatogr 367, 345-356 (1986)

3) 鈴木助治, 池田一夫, 岸本清子, 中村弘, 渡辺四男也 : 高速液体クロマトグラフィーによる染毛在中の酸化染料の定量, 東京衛研年報, 41, 70-74 (1990)

4) (財)日本薬剤師研修センター編集：医薬品承認申請ガイドブック 2000, 49, 薬事日報社, 東京(2000)

5) 山口一孝 : 植物成分分析法 上巻, 110-111, 南江堂, 東京(1958)