衛生化学
EISEI KAGAKU
32 (5) 350-358 (1986)

高速液体クロマトグラフィーによる綿ネルの寝間着中の ナフトール AS 及び関連色素の定量

小嶋茂雄,^a 鹿庭正昭,^a 中村晃忠,^a
高木篤也,^a 石橋正博^b

国立衛生試験所,^a 北九州市環境衛生研究所^b

High Performance Liquid Chromatographic Determination of Naphthol AS and Related Dyes in Cotton Flannel Nightdresses

SHIGEO KOJIMA,^a MASA-AKI KANIWA,^a AKITADA NAKAMURA,^a

ATSUYA TAKAGI^a and MASAHIRO ISHIBASHI^b

National Institute of Hygienic Sciences,^a 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku,

Tokyo 158, Japan and The Kitakyushu Municipal Institute of

Environmental Health Sciences,^b 1-2-1, Shinike,

Tobata-ku, Kitakyushu 804, Japan

(Received April 22, 1986)

By the collaborative study with Nagoya University Branch Hospital, we have found that naphthol AS (2-hydroxy-3-naphthanilide), an azoic coupling component, might be a causative agent of pigmented contact dermatitis from cotton flannel nightdresses (This journal, **32**, 359 (1986)). In the course of the study, we developed a simple method for the determination of naphthol AS in cotton flannels. Naphthol AS could be extracted quantitatively from flannels under reflux with methanol, and purified by silica gel column chromatography by using ethyl acetate as an eluate. After methylation with diazomethane, it could be determined by high performance liquid chromatography (HPLC) by use of the following conditions: column, Nucleosil 50-5 (Nagel, 250 mm × 4.6 mm i.d.); mobile phase, hexane-chloroform (12 : 5); flow rate, 1.0 ml/min; detector, ultraviolet detector; detection wavelength, 254 nm. Under these conditions, naphthol AS showed its peak at about 10 min, and its detection limit was found to be about 1 µg/g. Azo dyes in the methanol extracts were also determined by HPLC.

Naphthol AS was detected in all cotton flannel nightdresses worn by the patients of pigmented contact dermatitis (contents: 850—11700 µg/g, average: 5240 µg/g). It was also detected in 5 kinds of commercial products, all of which were cotton flannel nightdresses dyed in the same manner as those worn by the patients (contents: 920—10200 µg/g, average: 5760 µg/g). It could not be found in other types of flannels. These results could support the idea that naphthol AS may be a causative agent of contact dermatitis from cotton flannel nightdresses.

Keywords—cotton flannel nightdress; pigmented contact dermatitis; causative agent; naphthol AS; 2-hydroxy-3-naphthanilide; azo dye; high performance liquid chromatographic determination

緒 言

厚生省が全国 6 病院の皮膚科を対象に行っている「家庭用品による健康被害の病院モニター制度」において、綿ネルの寝間着を着用したために色素沈着性の接触皮膚炎を起こした症例が最近相次いで数例報告された。¹⁾ こ

の接触皮膚炎の特徴は、一般に患者の年齢が高く、ネルの寝間着が使われる冬期に発症し、首や前腕など寝間着の衿や袖口とよく接触してこすれる部分を中心に色素沈着を来すという共通の症状を呈したことである。著者らは、この接触皮膚炎の原因について、名古屋大学付属

Fig. 1. Chemical Structure of Naphthol AS
(2-Hydroxy-3-naphthanilide)

病院分院皮膚科の早川律子講師らと協力し、患者に対するパッチテストの結果と化学分析の結果を結び付けながら検討を行った結果、綿ネルの染色の際に用いられたナフトール AS (Fig. 1) が、この特異な接触皮膚炎を引き起こした原因物質であることを明らかにすることができた。²⁻⁴⁾

著者らは、この原因追求の過程で、患者が事故品のネルの布及びそのメタノール抽出物のパッチテストには陽性の反応を示すが、メタノール抽出後のネルの布には陰性の反応を示すこと、⁴⁾ 並びにこのネルがナフトール AS を用いて捺染染色されたものであることに注目し、メタノール抽出物中のナフトール AS 量及び AS 系のアゾ色素量の把握を試みた。ところが、このナフトール AS は毒性が低く、^{5,6)} これまでほとんど関心を持たれて来なかったため、Chemical Abstract を調べても、その定量法については全く報告が見当たらなかった。そこで、著者らは、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による定量法について検討し、ネルの寝間着中のナフトール AS、及びこれと共にメタノール中に抽出されてくるアゾ色素類を簡便に定量し得る方法を確立することができた。この方法によって事故品のネルの寝間着や市販のネルの試料の分析を行ったところ、ナフトール AS がこの接触皮膚炎の原因物質であることを裏付ける結果が得られた。

実験方法

1. 試料 Table I に今回分析に供した試料を示した。事故品 10 点は、名古屋大学 (No. 1—8) 東邦大学 (No. 9)、及び東京医大 (No. 10) の色素沈着性接触皮膚炎の患者が着ていたもので、いずれも色の濃い厚手のネルの寝間着であった。調査の結果、⁷⁾ このうち No. 3, 9 及び 10 の 3 点は同じ和歌山の染色工場でナフトール AS を用いて捺染染色されたものであることが分かった。No. 3 及び 10 のネルの染色に用いられた処理剤を Table II に示した。

(処理工程) 漂白→起毛→染色(下漬 #1, 捺染 #2)
→水洗

#1 ナフトール AS のアルカリ溶液にネルの布を漬けて、ナフトール AS を布に染み込ませた後、均一に絞る。

#2 下漬した布に芳香族アミンのジアゾニウム塩の溶液を付けて、繊維上でアゾ色素をつくって染め上げる。

また、市販のネル製品 13 点は、すべて横浜市から提供を受けたもので、No. 11—17 は事故品と同様の色の濃い厚手のネルの寝間着、No. 18—21 はこれらの寝間着とは染色方法の異なる色の薄いネルのパジャマ、また、No. 22, 23 は白たびであった。

2. 試薬及び器具 ナフトール AS (2-hydroxy-3-naphthanilide): 東京化成製の特級品を酢酸エチルから再結晶して用いた。

AS 系のアゾ色素類: 芳香族アミンのジアゾニウム塩とナフトール AS とを常法⁸⁾ により反応させて合成した。生成物をろ取り、乾燥後、ジクロロメタンに溶かしてアルミナカラムを通し、未反応のナフトール AS を除去した。カラムからの溶出物をジクロロメタンあるいは酢酸エチルから再結晶して用いた。Table II の処理剤を参考にして合成した 6 種の色素の構造を Fig. 2 に示した。

シリカゲル: Merck 製 Kieselgel 60 (70—230 mesh)。

アルミナ: Merck 製 Aluminiumoxid 90 (活性度 II—III, 70—230 mesh)。

クロマト管: 内径 10 mm, 長さ 30 cm の活栓付きガラス製クロマト管。

その他の試薬は市販の特級品を用いた。

3. HPLC 条件 分離カラム: Macherey-Nagel 製 Nucleosil 50-5 (250 mm×4.6 mm i.d.), 移動相: ヘキサノン-クロロホルム (12:5), 流速: 1.0 ml/min, 検出器: ATTO 製紫外可視検出器 SPECTROMONITOR II 型, 測定波長: 254 nm, カラム温度: 室温。

4. 定量法 4-1. 試験溶液の調製——試料を細かく切り、その約 1 g を正確に量り採って 100 ml のナス型フラスコに入れる。これにメタノール 50 ml を加え、還流冷却管を付け、水浴上で 30 分間加熱・還流して抽出を行う。抽出液をガラスろ過器でろ過して 100 ml のナス型フラスコに採り、ロータリーエバポレーターを用いて乾固する。このメタノールによる抽出操作を 3 回繰り返す。

得られた抽出物を少量の酢酸エチルに溶かして、シリカゲルカラム (クロマト管に、酢酸エチルを用いて湿式法により、シリカゲル 3 g を充填して作ったもの) に負荷し、酢酸エチル 50 ml で溶離するフラクションをと

TABLE I. Cotton Flannel Products Used for the Experiments

No.	Source	Patient	Kind of product	Color
Flannels worn by the patients				
1	Nagoya University	A	Nightdress	Red & blue
2		B		Green
3		C		Blue & red
4		C		Redish orange
5		D		Blue
6		E		Green & redish violet
7		E		Redish violet & blue
8		E		Blue & violet
9	Toho University	F		Redish brown
10	Tokyo Medical College	G		Redish violet
Commercially available flannels				
11	Yokohama city		Nightdress	Dark blue
12				Blue
13				Blue & red
14				Blue & brown
15				Blue & green
16				Redish violet
17				Wine red
18			Pyjama	Light yellow
19				Light pink
20				Light brown
21				Light blue
22			Tabi	White
23				White

TABLE II. Compounds Used for Dyeing Cotton Flannels

Flannel No. 3	Flannel No. 10
Grounding	
Naphthol AS ^{a)}	Naphthol AS ^{a)}
Sodium hydroxide ^{a)}	Sodium hydroxide ^{a)}
Anionic surfactant	
Printing	
Bases	Bases
Blue black T ^{a)}	Blue black T ^{a)}
Orange GC ^{a)}	Orange GC ^{a)}
Blue BB	Bordeaux GP
Violet B	Red B
Grey B	
Sizing agents	Sizing agents
Neutralizing agents	Neutralizing agents
Sodium acetate ^{a)}	Hydrochloric acid
	Sodium nitrite
	Sodium acetate ^{a)}

a) Used for both of flannels.

る。これを酢酸エチルにより 100 ml にメスアップし、試験溶液とする。

4-2. ナフトール AS の定量——ナフトール AS として 50—150 μg を含む量の試験溶液をとり、液量を約 5 ml に調整した後、氷冷下でジアゾメタン-エーテル溶液 1 ml を加え、約 45 分間放置してメチル化する。溶媒を留去後、ジクロルメタンに溶かして 5 ml とし、その 2 μl を HPLC 装置に注入する。得られたクロマトグラム上のナフトール AS のピークのピーク高さを測定し、予め標準液を用いて作成しておいた検量線から、試料中のナフトール AS の含有量を求める。

4-3. 色素の定量——ロータリーエバポレーターを用いて、ナフトール AS の定量に用いた残りの試験溶液から溶媒を留去する。残留物を少量のジクロルメタンに溶かして、アルミナカラム（クロマト管に、ジクロルメタンを用いて湿式法により、アルミナ 5 g を充填して作ったもの）に通して、ナフトール AS をアルミナに吸着させて除去する。ジクロルメタン 50 ml により色素を溶離させ、色素の濃度が 25—100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように液量

Fig. 2. Chemical Structures of Azo Dyes Prepared in Our Laboratory

を調整する。この液 2 μ l を採って HPLC 装置に注入し、得られたクロマトグラム上の各色素のピークのピーク高さを測定する。予め色素の標準液を用いて作成しておいた検量線から、メタノール抽出された各色素の量を求める。

結果並びに考察

1. ナフトール AS の抽出条件

著者らは、羊毛製品に防虫加工剤として用いられていたディルドリンの分析法について検討した経験⁹⁾から、羊毛や綿などの天然繊維から加工剤を抽出するには、繊維を膨潤させ得るメタノールが最も優れた溶媒であると考えている。また、ナフトール AS は、水にもヘキサンにもほとんど溶けないが、アセトン、酢酸エチル、メタノールなどの極性の有機溶媒には少し溶けるという性質をもっている。

そこで、メタノール及びアセトンを抽出溶媒に用いた場合の綿ネルからのナフトール AS の抽出挙動について、2種の事故品のネル (No. 1 及び 5) を用い、定量法に準じて操作を行って検討した。その結果を Fig. 3 に示す。

これから分かるように、メタノールの場合には、2回抽出を繰り返せばネルに含まれるナフトール AS をほぼ定量的に抽出できるのに対して、繊維をあまり膨潤し得ないアセトンの場合には、3回目にもまだ2-3%ほど抽出されてきており、3回合わせた抽出量もメタノール抽出の場合の70-80%に過ぎなかった。

以上の結果から、ナフトール AS の抽出には、ネルの布 1 g にメタノール 50 ml を加え、加熱・還流する操作を2回以上繰り返せばよいことが分かった。

2. シリカゲルカラムによるクリーンアップ

メタノール抽出物中には、界面活性剤などの極性物質がかなり含まれているので、シリカゲルカラムによりクリーンアップを行うこととした。そこで、ナフトール AS 650-2500 μ g を少量のジクロロメタンに溶かしてカラムに負荷した後、ジクロロメタンあるいは酢酸エチルで溶離した場合の回収率について検討した。

まず、ジクロロメタンを溶離液とした場合には、100 ml 流しても86-94%の回収率しか得られず、カラムの上部に淡い黄色のゾーンが残った。そこで、これを更に酢酸エチル 50 ml で溶離したところ、この黄色のゾーン

Fig. 3. Extraction Patterns of Naphthol AS from Cotton Flannels

Solvents: ●, ▲ methanol; ○, △ acetone.

が溶離し、添加量の3—5%のナフトールASがこのフラクションに検出された。これに対して、酢酸エチルを溶離液とした場合には、50 ml で98% ($n=3$) と定量的に回収されることが分かった。

以上より、シリカゲルカラムによるクリーンアップには、試料の抽出物をカラムに負荷した後、酢酸エチル50 ml で溶離させることとした。

なお、ネルからナフトールASとともに抽出される界面活性剤は、酢酸エチルでは溶離されず、ナフトールASの定量を妨害することはなかった。

3. ナフトールASのメチル化と検量線

本研究で用いたHPLC条件では、ナフトールASのままでは、ナフタレン環の2位の水酸基の影響で Fig. 4 A に示したようにテイリングピークとなるので、ジアゾメタンを用いてメチル化を行った。ナフトールASのメチル化が完了するまでの所要時間は約45分であった。メチル化体は Fig. 4 B のように保持時間約10分のシャープなピークを与え、ピーク高さ法により作成した検量線は、検討した範囲(ナフトールASの量として20—120 ng)においては、原点を通る良好な直線性を示した。試験溶液の全量を用い、メチル化後の液量を1 ml とし

Fig. 4. HPLC Chromatograms of Authentic Naphthol AS (A) and Its Methylated Product (B)

HPLC conditions: column, Nucleosil 50-5 (Nagel, 250 mm $\times$ 4.6 mm i.d.); mobile phase, hexane-chloroform (12:5); flow rate, 1.0 ml/min; detector, ultraviolet-visible detector; detection wavelength, 254 nm.

た時のナフトールASの検出限界は約1 μ g/gであった。

4. 妨害物質の検討

ネル中に共存して、ナフトールASの定量を妨害する可能性のある化合物としては、繊維上で生成する色素類、並びにナフトールASの類似体が挙げられる。そこで、Fig. 2のアゾ色素類、及びFig. 5のAS類似体をジアゾメタンによってメチル化し、ヘキサン-クロロホルム(12:5)を移動相としてHPLCのクロマトグラムを測定し、ナフトールASに対する相対保持時間(R)を求めた。Table IIIにその結果を示した。

アゾ色素類の中では、Ⅲの赤色色素が最もナフトールASに近い位置にピークを示したが、ナフトールASの定量には妨害とならなかった(分離度 $R_s=1.15$)。

AS類似体の中では、ナフトールAS-D及びAS-MXがナフトールASの近くにピークを示した。AS-Dはブラウスなどの高級品の染色に使われており、ネルの寝間着にも使われる可能性があるが、そのピークはナフトールASのピークと十分離れており、定量には妨害となら

Fig. 5. Chemical Structures of Naphthol AS Analogues

TABLE III. Retention Times of Dyes and Naphthol AS Analogues

Compound	Retention time (min)	R_t^a	Methylated product	
			Retention time (min)	R_t^a
Naphthol AS			9.8	1
Dyes				
I (Orange)	6.9	1	5.3	0.54
II (Redish orange)	10.0	1.45	8.5	0.87
III (Red)	11.6	1.69	9.2	0.94
IV (Red)	13.6	1.97	8.6	0.88
V (Blue)	20.2	2.93	14.8	1.51
VI (Redish violet)	56.0	8.12	- ^{b)}	-
Naphthol AS analogues				
Naphthol AS-D			10.3	1.05
Naphthol AS-MX			10.0	1.02
Naphthol AS-BO			11.1	1.13
Naphthol AS-BS			14.7	1.50

a) Relative retention time.

b) Didn't show any peaks for 50 min after injection.

HPLC conditions used were the same as those in Fig. 4.

なかった ($R_s=1.09$). 一方, AS-MX のピークはナフトール AS のすぐ後に現われ, 共存すれば妨害を与えるものと思われるが, 調査したところ, AS-MX は現在ネルの染色には使われていないことが分かった.¹⁰⁾

5. 色素の分析

患者はいずれもネルのメタノール抽出物には陽性の, また, 抽出後のネルには陰性の反応を示した.⁴⁾ そこで, 著者らはメタノールで抽出される色素類も原因物質であり得ると考えて, その量的な把握を行うために分析法について検討した.

事故品のネルの布をメタノール抽出すると, 抽出液は赤一赤紫色となり, 布は赤味がうすれて青っぽくなる.

そこで, No. 10 の事故品のネルからの I (オレンジ色素), IV (赤色素), 及び VI (赤紫色色素) の各色素の抽出挙動について検討したところ, I はナフトール AS と同様に 2 回の操作でほぼ全量が抽出されてしまうが, IV 及び VI は 4 回目にもなおかなりの量が抽出されてくることが分かった. したがって, メタノールによる 3 回抽出では, ネルの布に含まれている色素のうちの一部分が, 構造が簡単で共鳴系の短い赤色系の色素を中心として抽出されてくるものと思われる.

また, Fig. 2 の色素類各 250 μ g を少量のジクロロメタンに溶かしてシリカゲルに負荷し, 酢酸エチル 50 ml で溶離した場合には, V 及び VI の色素の回収率がやや悪

Fig. 6. HPLC Chromatograms of a Mixture of Authentic Azo Dyes

Mobile phase: A) hexane-chloroform (12:5), B) hexane-chloroform (1:1).

Other HPLC conditions were the same as those in Fig. 4.

Peaks I–VI indicate dye I–VI in Fig. 2.

かったほかは、いずれも定量的に回収された。一方、ナフトール AS 及び Fig. 2 の色素類各 250 μg をジクロルメタンに溶かしてアルミナカラムに通すと、ナフトール AS は黄色のゾーンとなってカラムの上部に吸着されて溶離せず完全に除去されたが、各色素はジクロルメタン 50 ml によってほぼ定量的に回収されることが分かった。

Fig. 6 に Fig. 2 の色素類の混合物の HPLC クロマトグラムを示した。I–IV の 4 種の色素は、ナフトール AS と同じヘキサン-クロロホルム (12:5) によって分析が可能であったが、V 及び VI の色素の分析にはヘキサン-クロロホルム (1:1) を移動相として用いる必要があった。検討した範囲 (各色素の量として 50–200 ng) では、各色素の注入量とピーク高さとの間にいずれも原点を通る直線性が認められた。

6. 分析結果

Table IV に、ネルの試料中のナフトール AS 量及びこれと共にメタノール中に抽出される AS 系のアゾ色素量の分析値を示した。また、No. 10 の事故品のネルの場合の HPLC クロマトグラムを Fig. 7 に示した。

事故品のネルの布 10 点からは、いずれもナフトール AS が検出され、850–11700 $\mu\text{g/g}$ ($n=5$, 相対標準偏差

Fig. 7. HPLC Chromatograms for Cotton Flannel Nightdress No. 10 in Table I

HPLC conditions were the same as those in Fig. 4.

Peaks: A) I-ME, III-ME and AS-ME, methylated products of dye I in Fig. 2, dye III and naphthol AS, respectively.

B) I, dye I; III, dye III; X, unknown dye.

2.3–7.5%), 平均 5240 $\mu\text{g/g}$ のレベルにあることが分かった。また、メタノール抽出物中に検出された色素は、主として I, II, IV 及び VI の 4 種であったが、事故品のいずれにも共通して含まれている色素はなく、その分析値も一般にナフトール AS の量に比べて少ないもの

TABLE IV. Analytical Results of Naphthol AS and Related Dyes in Cotton Flannels

No.	Naphthol AS ($\mu\text{g/g}$) ^{a)}	Dyes ($\mu\text{g/g}$)					
		I	II	III	IV	V	VI
Flannels worn by the patients							
1	11700	260	350		2890		
2	8700		290				
3	4900	500	70				710
4	850	530	2970				
5	2860		40		1250		
6	3300				1600		560
7	2370	1050			1560		
8	3320	320	170				240
9	8900				2790		510
10	5500	280			3530		560
Commercially available flannels							
11	920		Trace				
12	2700						
13	10200				700		
14	8060	1010	110				
15	6900	700	290		140		
16	nd ^{b)}						
17	nd						
18	nd						
19	nd						
20	nd						
21	nd						
22	nd						
23	nd						

a) Average value of five repeated determinations.

b) Not detected.

であった。

以上の分析結果から、ナフトール AS が事故品に共通で、量的にも多い要素であることが分かった。こうした事実は、ナフトール AS がこの色素沈着性接触皮膚炎の原因物質であるとの推定を強く裏付けるものであると言えよう。

一方、市販のネル製品のうち、No. 11—15 の 5 点から 920—10200 $\mu\text{g/g}$ ($n=5$, 相対標準偏差 3.2—6.7%), 平均 5760 $\mu\text{g/g}$ のナフトール AS が検出された。これらはいずれも事故品と同様の色の濃い厚手のネルの寝間着であった。このように、市販のネルの寝間着にも事故品と同じレベルのナフトール AS が含まれていることが分かった。染色工場では、染色後に水洗が行われ、未反応の処理剤の除去が図られているが、ナフトール AS は強アルカリ性でないと水にあまりよく溶けないため、布地中にかなりの量が残ってしまっているものと思われる。

しかしながら、市販のネル製品の中には、No. 16, 17 の 2 点のように色の濃い厚手のネルの寝間着であるにもかかわらず、ナフトール AS を全く検出しないものがあった。これは、一部にはナフトール AS を使わない別の染色法で染められたものも出回っていることを示している。また、No. 18—21 の色の薄いネルのパジャマ、及び、No. 22, 23 の白たびからはナフトール AS は検出されなかった。したがって、こうした色の薄いネルの染色には、ナフトール AS は用いられないものと思われる。

ネルの寝間着による色素沈着性接触皮膚炎患者の新たな発生をなくすには、このナフトール AS について早急に何らかの対策をとる必要があるが、本定量法はそうした対策をとる上での基礎となりうるものと考えらる。

本研究の一部は日本薬学会第 105 年会 (1985 年 4 月, 金沢) において発表した。

謝辞 事故品のネルの寝間着をご提供頂きました名 提供下さいました横浜市衛生局公衆衛生課の方々に深謝
古屋大学・早川律子先生，東邦大学・石原 勝先生，東 致します。
京医大・外間治夫先生，ならびに市販のネルの試料をご

引用文献

- 1) 厚生省モニター病院連絡会議資料，1983年，1984年。
- 2) 早川律子，松永佳世子，小嶋茂雄，鹿庭正昭，中村晃忠，日皮会誌，**95**，1441 (1985)。
- 3) R. Hayakawa, K. Matsunaga, S. Kojima, M. Kaniwa, A. Nakamura, *Contact Dermatitis*, **13**, 20 (1985)。
- 4) 小嶋茂雄，鹿庭正昭，中村晃忠，早川律子，松永佳世子，衛生化学，**32**，359 (1986)。
- 5) N.V. Prosolenko, *Tr. Khar'k. Med. Inst.*, **124**, 9 (1975) [*Chem. Abstr.*, **89**, 209876 (1978)]。
- 6) 国立衛生試験所の未発表データ。
- 7) 厚生省生活衛生局家庭用品安全対策室の調査による資料，1979年，1983年。
- 8) 日本化学会編，“実験化学講座20 有機化合物の合成II,” 丸善，p.347 (1956)。
- 9) 鹿庭正昭，毛利潤子，小嶋茂雄，中村晃忠，大場琢磨，衛生化学，**23**，7 (1977)。
- 10) 厚生省生活衛生局家庭用品安全対策室による調査，1986年。