〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
36 (2) 133-138 (1990)

化粧品用赤色 201 号の副色素の分析とその変異原性に関する研究

宮越 護, 早川ゆみ子, 永田 稔, 永山富雄
東京薬科大学

Studies on the Analysis of the Subsidiary Dyes of Lithol Rubine B and Their Mutagenicities

MAMORU MIYAGOSHI, YUMIKO HAYAKAWA, MINORU NAGATA and TOMIO NAGAYAMA
Tokyo College of Pharmacy, 1432-1, Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03, Japan

(Received September 20, 1989)

Five subsidiary dyes of Lithol Rubine B (C.I. 15850) were synthesized to clear the chemical structures of mutagenic impurities in the commercial cosmetic Lithol Rubine B. Their analyses by HPLC were investigated and the mutagenic activities examined by Ames test by using *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100.

The subsidiary dyes and Lithol Rubine B were completely separated by the gradient HPLC analysis by using an Inertsil ODS column and acetonitrile-water-formic acid system as a mobile phase. The subsidiary dyes showed no mutagenic activities to *S. typhimurium* with or without S9mix.

These results suggest that the mutagenic activities may not be due to the subsidiary dyes but to some reaction intermediates in the synthetic process of Lithol Rubine B.

Keywords — Lithol Rubine B; commercial azo-dye; mutagenicity; Ames test; mutagenic impurity; subsidiary dye; by-product; reaction intermediate; azo-dye separation; gradient HPLC

緒 言

著者らはこれまでに衛生化学的見地から、化粧品用色素の内、アゾ系色素を中心に検討を加え、¹⁾ 赤色 225 号及び赤色 501 号に関しては、市販色素の変異原性が残存する原料物質に起因することを解明した。¹⁰⁾ 赤色 201 号に関しては、色素合成反応時におけるジアゾ液〔A〕とカップリング液〔B〕の反応量の比率（モル比）を 3 : 2 及び 6 : 5 等のように〔A〕 > 〔B〕とした時にのみ変異原性物質が生成することを確認した。なお、〔A〕 > 〔B〕で合成した赤色 201 号粗結晶の酢酸エチル抽出物及び市販色素酢酸エチル抽出物中には着色物質も含めて多数の夾雑物が確認された。¹⁰⁾ これらの中には、合成時の未反応原料・反応中間体・副色素（原料やその類縁物質から副生する色素）等の存在が推察される。

ところで、これまでに夾雑物が人体に対して問題になった例として、赤色 219 号中に夾雑した副色素

の 1-フェニルアゾ-2-ナフトールによる接触皮膚炎に関する報告がある。²⁾ 一方、著者らの市販赤色 505 号の HPLC 分析の結果では、通常構造式の示されている 2,4-ジメチル置換体以外に 2,5 及び 2,6 置換体が混在する市販品が存在することを見出だしている。^{14,6)} 原因として、色素合成原料に 3 種の異性体を含む混合キシリジンが使用されたものと考えられる。¹⁰⁾ このように副色素に関しての問題は必ずしも十分解明されていないのが現状であり、副色素等の夾雑物についての衛生化学的研究が必要と考えられる。

一方、米国では、合成色素に関し、純色素含量はもちろん、原料・反応中間体・副色素含量等についても許容値が定められているものもあり、³⁾ 純色素以外の夾雑物に対する衛生化学的な考慮がなされている。

以上の観点から、著者らは市販赤色 201 号中の変異原性夾雑物の構造解明のためには、関連する副色

素についての検討が必要であると考えた。Fig. 1 に赤色 201 号の主原料の合成経路を示した。2-アミノ-5-メチルベンゼンスルホン酸(4)は(1)のニトロ化・還元・スルホン化により合成されるが、^{4a)} (4)中には主な夾雑化合物として、未スルホン化体の(3)や異性体の(5)が考えられる。

一方、3-ヒドロキシ-2-ナフタレンカルボン酸(10)は、(6)のスルホン化(160°C)・アルカリ融解で生ずる(8)のナトリウム塩(9)に、加圧下 240°C で CO₂ を作用させて得られる。ところで、120°C で(9)に CO₂ を作用させると(11)を生じるが、更に加熱(145—160°C)すると CO₂ を放出し(12)と(8)に分解する。^{4b)} したがって、原料(10)中に主として夾雑する化合物には(8)が考えられる。

色素原料(4)及び(10)とそれらに主として夾雑する化合物の組み合わせにより生成可能な副色素及び赤色 201 号の構造式を Fig. 2 に示した。

本報では、これら 5 種の副色素を合成し、HPLC 等による機器分析及び Ames 試験による変異原性の有無を検討したので以下報告する。

実験方法

1. 副色素類の合成 Fig. 2 に示した副色素 5

Fig. 1. Synthetic Processes of Starting Materials of Lithol Rubine B

種と赤色 201 号をジアゾカップリング反応により合成した。精製は、各々の色素に適した溶媒で再結晶を 3 回繰り返して行った。

2. 機器分析 前項 1 で合成した色素について、元素分析、質量分析、紫外・可視吸収スペクトル測定、HPLC による分析を行った。

1) 元素分析・質量分析——試料を減圧下 (5 mmHg) 80°C で乾燥し分析した。

2) 紫外・可視吸収スペクトル測定——乾燥試料 10 mg をメタノール 100 ml に溶解し原液とした。スペクトル測定は、各試料の 10 ppm メタノール溶液について島津 UV-260 型分光光度計を用いて行った。

3) HPLC 分析——装置は日立製作所 L-4200 型検出器、665 A-52 型カラムオーブン、D-2500 型クロマトインテグレーター付 L-6200 型インテリジェントポンプを使用した。カラムはガスクロ工業製 Inertsil ODS 10 (250×4.6 mm i.d.) を、溶離液はアセトニトリル-水-蟻酸混液を用いた。カラム温度は 40°C、検出波長は 500 nm、注入量は 5—20 μ l としグラジエント分析を行った。

3. 変異原性試験 既報^{1a-c,e)} 同様、Ames の原報⁵⁾ にプレインキュベーションを組み入れた矢作の

- (I) : $R_1=H, R_2=H, R_3=H$.
 (II) : $R_1=H, R_2=SO_3Na, R_3=H$.
 (III) : $R_1=SO_3Na, R_2=H, R_3=H$.
 (IV) : $R_1=H, R_2=H, R_3=COONa$.
 (V)^{a)} : $R_1=H, R_2=SO_3Na, R_3=COONa$.
 (VI) : $R_1=SO_3Na, R_2=H, R_3=COONa$.

Fig. 2. Chemical Structures of Lithol Rubine B and Its Subsidiary Dyes

a) Lithol Rubine B (C.I. 15850).

Fig. 3. Absorption Spectra of Lithol Rubine B and Its Subsidiary Dyes

a) Lithol Rubine B (C.I. 15850).

Absorption spectrum of each compound in methanol solution (10 ppm) was measured with Shimadzu UV-260 spectrophotometer. The numbers of the absorption spectra correspond to the numbers marked to the chemical structures in Fig. 2. The compound I, II and III showed the same absorption maximum in methanol ($\lambda_{\max}=480$ nm) and their extinctions ($E_{1\%}^{1\text{cm}}$) were 517, 434 and 415, respectively. For the other dyes (IV, V and VI), the $\lambda_{\max}$ were 510 nm and the $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ were 360, 505 and 323, respectively.

方法⁶⁾に従って行った。

結果及び考察

1. 副色素類の元素分析・質量分析

Table Iに元素分析の結果を示した。表中の試料番号はFig. 2における各色素に付した番号で示したが、以下の図表でも同様取り扱うことにする。元素分析の結果、各色素ともに計算値と分析値は一致した。一方、チャートは省略したが、質量分析の結果からも各色素の構造を裏付けるイオンピークが得られた。なお、副色素の内IIはカラーインデックス収載色素 (C.I. 15590, C.I. Pigment Red 70) である

TABLE I. Elemental Analysis of Lithol Rubine B and Its Subsidiary Dyes

Test compound	Elemental analysis (%)					
	Calcd ^{a)}			Found ^{a)}		
	C	H	N	C	H	N
I ^{b)}	77.84	5.38	10.68	77.90	5.42	10.69
II	56.04	3.60	7.69	55.81	3.70	7.42
III	56.04	3.60	7.69	55.91	3.52	7.61
IV	65.85	3.99	8.53	65.70	4.04	8.52
V ^{c)}	50.24	2.81	6.51	49.92	2.77	6.53
VI	50.24	2.81	6.51	49.94	3.01	6.43

a) Calcd: theoretical value; Found: experimental value.

b) The numbers of the compounds correspond to the numbers marked to the chemical structures in Fig. 2.

c) Lithol Rubine B (C.I.15850).

が、他の4種は未収載色素である。⁷⁾

2. 副色素類の紫外・可視吸収スペクトル

Fig. 3には各色素の紫外・可視吸収スペクトルを示した。色素I, II及びIII (Aグループ) では赤色色素としての極大吸収波長 ($\lambda_{\max}$) は同一の480 nmであり、色素IV, V及びVI (Bグループ) の $\lambda_{\max}$ も同一の510 nmであった。Aグループの構造上の相違はスルホン基の有無及びその置換位置であるが、その相違は $\lambda_{\max}$ に対して影響はなかった。同様に、Bグループでも、その相違は $\lambda_{\max}$ に対して影響はなかった。一方、A及びBグループ間の構造上の相違はカルボキシル基の有無である。Bグループ色

素の $\lambda_{\max}$ は A グループ色素の $\lambda_{\max}$ より 30 nm 長波長に移動しており、これはカルボキシル基の有無の影響によるものと推察される。このように吸収スペクトル上には置換基の有無及び置換位置による影響が規則的に反映されている。

3. 副色素類の HPLC

逆相分配カラムである Inertsil ODS カラムを用いて色素 6 種の分離を検討した。著者らは赤色 505 号異性体の分離に Zorbax ODS カラムを用い、アセトニトリル-水混合系を移動相とした時に最も良い結果を得ている。¹⁰⁾ ところで、色素 II, III, V 及び VI (C グループ) に比べると色素 I 及び IV (D グループ) はスルホン基を有しておらず、その極性は C グループよりも低い。逆相分配クロマトグラフィーの一般則に従うと、D グループの保持時間は C グループに比べてかなり長いものと推察される。

これを考慮に入れ、色素 6 種の同時分離条件を検討したところ、Inertsil ODS カラムを用い、0.04% 蟻酸を含むアセトニトリル-水混合液 (3 : 7, v/v) 及び 0.04% 蟻酸を含むアセトニトリル-水混合液 (8.5 : 1.5, v/v) を移動相 A 及び B として Table II に示したグラジエント条件で良い結果が得られた。Fig. 4 にその時の色素 6 種のクロマトグラムを示した。

移動相 A による C グループの溶出順は VI > III > V > II の順であった。その順序には規則性が認められ、メチル基の *m* 位よりも *o* 位にスルホン基が置換した方が溶出順位は早かった (VI > V 及び III > II)。また、カルボキシル基の存在も溶出順位を早めた (VI > III 及び V > II)。移動相 B による D グループの溶出順序もカルボキシル基を有する方が早かった (IV > I)。

4. 変異原性試験

Table III に副色素類について変異原性試験を行った結果を示したが、いずれの色素にも変異原性は認められなかった。なお、色素 V (赤色 201 号) は変異原性を示さないことが確認されており、¹⁰⁾ 試験は実施しなかった。今回の結果より、市販赤色 201 号中に夾雑する変異原性物質は、これらの副色素類ではないことが明らかになった。

今回合成した 5 種の副色素は、赤色 201 号合成時に比較的夾雑しやすいと考えられるものである。色素原料合成経路 (Fig. 1) から考えれば、5 種以外の副色素の生成も有り得るが、その量は極微量で変異原性出現への寄与も非常に少ないものと考えられる。したがって、赤色 201 号中に夾雑する変異原性物質は、色素合成時の反応中間体に由来する可能性の高いことが示唆された。今後は、この反応中間体を中心に検討する必要がある、現在赤色 201 号 (6 : 5) 酢酸エチル抽出物中からの変異原性物質の分離精製について検討中である。

結 論

化粧品用赤色 201 号の副色素類の衛生化学的検討として、HPLC による分離条件を検討したところ、Inertsil ODS カラムとアセトニトリル-水-蟻酸系移動相を用いるグラジエント分析により、赤色 201 号とその副色素 5 種が良好に分離した。

また、副色素の変異原性を検討したところ、いずれも変異原性は検出されず、赤色 201 号中の変異原性物質が 5 種の副色素と異なる構造を有することが明らかになり、反応中間体である可能性が示唆され

TABLE II. Gradient Profiles Employed for the Separation of Dyes

Time (min)	Flow rate (ml/min)	% Carrier A vs carrier B ^{a)}
0	3.0	100
18	3.0	100
22	3.0	0
28	3.0	0
32	3.0	100
Indefinite	3.0	100

a) Carrier A: acetonitrile-water (3 : 7, v/v) with 0.04% formic acid, carrier B: acetonitrile-water (8.5 : 1.5, v/v) with 0.04% formic acid.

Fig. 4. HPLC Chromatogram of Lithol Rubine B and Its Subsidiary Dyes

Operating conditions — column: Inertsil ODS (250 × 4.6 mm i.d.); mobile phase: as shown in Table II; detecting wavelength: 500 nm; sample injection: about 167 ng of dye in 10 μ l methanol; column temperature: 40°C.

TABLE III. Mutagenic Activities of Subsidiary Dyes

Test compound	Concentration ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of His ⁺ revertants/plate			
		TA 98		TA 100	
		−S9 ^{a)}	+S9 ^{a)}	−S9	+S9
DMSO ^{b)}	—	36.4(15) ^{c)}	52.3(10)	121.1(15)	116.3(12)
4NQO ^{d)}	0.05	—	—	522.3(14)	—
	0.10	172.7(14)	—	778.8(16)	—
	0.20	242.7(16)	—	—	—
B[a]p ^{d)}	1	—	87.6(11)	—	179.4(12)
	2	—	158.1(11)	—	279.1(12)
I ^{e)}	1	34 ^{f)}	48	140	113
	10	40	43	116	88
	100	31	41	110	79
	1000	28	49	130	75
II	1	39	57	102	110
	10	32	38	110	120
	100	46	55	129	102
	1000	38	44	115	114
III	1	30	60	117	132
	10	31	50	118	137
	100	37	65	133	133
	1000	42	41	135	125
IV	1	32	44	124	82
	10	34	52	126	77
	100	38	40	107	68
	1000	23	Killing	92	Killing
VI	1	32	49	137	141
	10	37	42	129	138
	100	39	55	113	135
	1000	35	48	128	130

a) −S9: without S9mix, +S9: with S9mix.

b) DMSO: solvent control.

c) Mean (number of experiments).

d) 4NQO: reference compound without S9 mix; B[a]p: reference compound with S9mix.

e) The numbers of the test compounds correspond to the numbers marked to the chemical structures in Fig. 2.

f) The numbers of revertant colonies are the averages of two assays.

た.

引用文献

- 1) a) 宮越 護, 早川ゆみ子, 永山富雄, 衛生化学, **29**, 212 (1983); b) 宮越 護, 早川ゆみ子, 永田 稔, 永山富雄, *ibid.*, **31**, 79 (1985); c) *Idem*, *ibid.*, **33**, 276 (1987); d) 早川ゆみ子, 宮越 護, 小林恵美子, 永田 稔, 永山富雄, *ibid.*, **29**, 274 (1983); e) 早川ゆみ子, 宮越 護, 永山富雄, *ibid.*, **30**, 11 (1984).
- 2) 小塚雄民, 田代 実, 奥村雄司, 藤本圭一, 中村由美, 橋本誠一, 中南 元, 皮膚, **19**, 191 (1977); T. Kozuka, M. Tashiro, S. Sano, K. Fujimoto, Y. Nakamura, S. Hashimoto, G. Nakaminami, *Contact Dermatitis*, **5**, 297 (1979).
- 3) Sidney Williams (ed.), "Official Methods of Analysis of the AOAC," 14th ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc., Virginia, 1984, pp.639—657.
- 4) a) 小方芳郎, 増尾富士雄, 小田良平, 吉田善一, 岡野正弥, 三枝武夫, 古川淳二, 鶴田禎二, 大西

- 章, “大有機化学 9 卷, 芳香族化合物 I,” 第 1 版, 小竹無二雄監修, 朝倉書店, 東京, 1958, p.486 ;
b) *Idem*, “大有機化学 11 卷, 芳香族化合物 III,” 第 1 版, 小竹無二雄監修, 朝倉書店, 東京, 1959, pp.189—195.
- 5) B.N. Ames, J. McCann, E. Yamasaki, *Mutat. Res.*, **98**, 101 (1975).
 - 6) 矢作多貴江, 蛋白・核酸・酵素, **20**, 1179 (1975).
 - 7) “Color Index,” 3rd ed., Vol. 4, ed. by the Society of Dyers and Colorists and the American Association of Textile Chemists and Colorists, Bradford and London, 1971, p.4080.