食用色素黄色 2 号および黄色 3 号に対する検討

Studies on the Food Dyes Yellow AB and Yellow OB

東京慈恵会医科大学公衆衛生学教室

竹 村 望・山 村 行 夫・中 島 ち せ
福 田 美 和 子・秋 山 俊

Nozomi Takemura, Yukio Yamamura, Chise Nakajima,
Miwako Fukuda and Takashi Akiyama

Department of Public Health, The Jikei Medical College

It is said that the food dye, Yellow AB or Yellow OB, contains often the impurity of the original dyestuff intermediate, namely β -naphthylamine which is potent carcinogen. These industrial food dyes manufactured in our country were examined and it was found that all the food dyes, yellow AB and Yellow OB, examined contained a small amount of β -naphthylamine.

The main aromatic amines as the metabolites in the urine of experimental animals fed with these food dyes were aniline or *o*-toluidine and its derivatives.

It is desirable to cease the use of such food dye as Yellow AB or Yellow OB which contains carcinogenic intermediate even if its amount is a very little.

食用色素の許可基準は、各国により異なるが、Yellow AB および OB、即ちわが国でいう黄色 2 号および 3 号の如き油溶性色素（図 1）を許可している国は、今日少ない。Yellow AB, OB は、原料に β -naphthylamine を使う。これは、強い膀胱発癌性物質として知られている。この色素をつくる際、 β -naphthylamine をカップリングさせるわけだが、反応が完全に行なわれにくく、もとのアミンのまま、不純物として少量が残留するといわれている。そこで、著者らは、わが国の数社の製品について、これらの色素の中に、不純物として残留する遊離の β -naphthylamine 量を測定した。

発癌性という見地から、これら色素の代謝物に関して、Hueper は、アゾ基が切れて、2-amino-1-naphthol が出現する可能性を論じているが¹⁾、著者らは、ダイオキネズミ、ウサギにこれらの色素を経口投与して、尿中に代謝されて出てくる芳香族アミンについて検討した。

実験方法

1. 色素中の総芳香族アミン量の測定。

1) 色素中のアミンの抽出。

図 2 に示す如く、Conway の方法²⁾を modify した方法によって、まず色素 5g をエーテル 50 ml に溶かして分液漏斗にとり、0.2 N-HCl（以下 HCl はすべて 0°C の

ものを用いる）の 25 ml を加えてよく振盪して抽出、HCl 層をとり、さらにもう 2 回同一のを行ない、合計 75 ml の HCl 層をとり、エーテル層をすて、この HCl にエーテル 25 ml を加えて分液漏斗中で振盪し、エーテル層と HCl 層を分けてとる。この操作は 2 回行なう。分離したエーテル層 (50 ml) には、0.2 N-HCl 25 ml を加えて分液漏斗中で振盪し、エーテル層はすてて HCl 層をとる。採取した HCl はすべて 100 ml のメスコルベンに入れ、最後に画線まで 0.2 N-HCl を補足して全量 100 ml とする。

2) アミンの比色定量³⁾。

上述の 0.2 N-HCl 抽出液から 2.5 ml をとり、蒸留水 2.5 ml を加えて 0.1 N-HCl 液 5 ml とし、これに冷却した 0.1% 亜硝酸ソーダ液を 1 ml 加えて 3 分間放置する。これに 0.5% スルファミン酸アンモンの 1 ml を加えてよく混和して、2 分間放置する。次に 1% N-(1-naphthyl)-ethylendiamine dihydrochloride の 1 ml を加えて混和した後、全量 10 ml になるまで 0.1 N-HCl を補足する。40 分間放置した後、565 m μ の波長で光電光度計で測定する。 β -Naphthylamine の中に含まれるアミンの濃度 (μ g) に対する吸光度の関係は、図 3 に示す如き直線関係を得る。これによって求めたアミン量を 200 倍したものが試料中の総アミン量である。

図 1

図 2

図 3

3) アミンの薄紙クロマトグラフィー半定量。

上述の 0.2 N・HCl 抽出液から、7 ml をコルベンにとり、冷却した 0.5 N 亜硝酸ソーダ 0.2 ml を加えて氷室に 5 分間置く。一方、他のコルベンに、1 M 炭酸ソーダ 2 ml と 0.05 N・R 酸 (2-naphthol-3, 6-disulfonic acid sodium salt) の 1 ml とを混じたものをつくり、氷室から前者の液を出してこれと混ぜると、反応して紅色を呈する液を得る。この 0.5 ml を、Whatman No. 1 薄紙につけ、同時に既知濃度の β -naphthylamine 液のスポットも 0.5 ml づつつけて展開する。展開液は、0.1 N・NaOH 100 ml を、*n*-butanol 50 ml と共に、分液漏斗で約 10 分間振盪した後に分離した水層を用いる。展開後、スポットを比色半定量する。微量の場合も、紫外線下で行なえば、強い螢光により一層よく同定、半定量できる。Rf は、0.46 である。

2. 色素の代謝産物の同定。

実験動物として、雄のウサギ (体重 2~2.5 kg) を 2 羽、雄のダイコクネズミ (体重 150 g) を 5 匹用いた。

色素は再結晶して、不純物としてのアミンを除いたものを用い、この色素 Yellow OB の 40 mg を落花生油 1 ml に溶き、これをウサギに週 2 回、ゾンデで各回 5 ml 宛 (色素 200 mg) 経口投与した。Yellow AB は、ウサギに対して毒性が強いため、比較的抵抗性のあるダイコクネズミに同様の分量で溶いたものを 0.5 ml 宛週 2 回経口投与した。

これらの動物の尿を、投与後 2 日間、ドライアイス下に採取し、フリーザーに貯蔵し、ある程度たまってから

抽出を行なった。すなわち、尿に半量の硫酸アンモンを溶かした後、分液漏斗に入れて、これに尿の半量のエーテル・アルコール (3:1) を加えて振盪し、エーテル・アルコール層をとる。この操作を4回くり返してエーテル・アルコール層に充分抽出を行なう。次いで、これを rotating evaporator で蒸発させて残渣を得る。これを少量のメタノールに溶き、カラムクロマトグラフィーにかける。カラムは, aluminium oxide (Merk 製) をエーテル・アルコール (3:1) に溶いてガラス管につめ、展開溶媒はこのエーテル・アルコール溶媒を 100 ml 用いて展開する。溶出した展開液を蒸発させて残渣を得る。これを少量のメタノールに溶かして、Silica gel G 薄層クロマトグラフィーにかける。展開溶媒としては、一つは、石油エーテル：トルエン：クロロフォルム：*n*-ブタノール (14:3:2:1) のもの、もう一つは、石油エーテル：エーテル：酢酸 (70:30:1) を用いた。

結 果

1. 色素に含まれる遊離の β -naphthylamine 量。

調査したすべての製品に、 β -naphthylamine が含まれていることが認められた。結果は表1に示す如くであるが、少ないもので約 40 ppm から、多いもので約 300 ppm を少し越えるものもあった。これらの色素をつくる際、 δ -toluidine や, aniline は完全にジアゾ化されるが、 β -naphthylamine のカップリングがどうも完全に行なわれないようである。それ故、比色定量で、アミン量として測定されるのは、結局、 β -naphthylamine の量である。クロマトグラフィーの結果では、製品の中に極少量の α -naphthylamine の含まれるものもあった。

表 1 黄色2号および3号に含まれる
 β -Naphthylamine の量

色素	製品	比色定量法により求めた量 ppm	薄紙クロマトグラフィー 半定量法により求めた量 ppm
黄色2号	A	47	40
	B	125	100
	C	63	60
	D	148	125
	E	120	112
黄色3号	A	323	300
	B	165	150
	C	65	50
	D	95	75

2. 色素の代謝産物。

図4および5は薄層クロマトグラムで、(I)は展開溶媒として、石油エーテル：トルエン：クロロフォルム：*n*-ブタノールを用いたもの、(II)は石油エーテル：エーテル：酢酸を用いたものである。

図4は、Yellow AB のクロマトグラムで、(I)に示す尿抽出液のスポットの (3) は色素 (2) は δ -toluidine, (1) は δ -toluidine の代謝された誘導体である。もし色素の代謝物として 2-amino-1-naphthol ができるとすれば、(4) と同じ位置にスポットが出るはずであるが、これは認められない。(4) のスポットは、合成 2-amino-1-naphthol のスポットである。(II) のクロマトグラムで、尿抽出液のスポットは、(1) が aniline の誘導体、(2) が aniline (3) が aniline の代謝された誘導体である。

図 4 Yellow AB の場合

図 5 Yellow OB の場合

図5は、Yellow OB のクロマトグラムで、(I)の場合、尿抽出液のスポットとしては、(1)が $\bar{o}$ -toluidine の誘導体、(2)が $\bar{o}$ -toluidine、(3)が色素である。(4)は、合成 2-amino-1-naphthol のスポットである。(II)の場合に、尿抽出液のスポットとしては、(1)が $\bar{o}$ -toluidine の誘導体、(2)が $\bar{o}$ -toluidine、(3)と(4)が色素である。

考 察

食用色素 Yellow AB, OB を製造する除、原料として用いる前者の場合の aniline、後者の場合の $\bar{o}$ -toluidine は、発癌の危険性はないと今日考えられているし、色素をつくるとき行なうこれらのジアゾ化は、まず完全に行なわれるので、出来上った色素の中に、これらの芳香族アミンが遊離のかたちで残ることはまずない(図1参照)。しかし、ジアゾ化した後に、 β -naphthylamine とカップリングする場合に、カップリングが完全に行かないで、 β -naphthylamine が遊離のかたちで残ることは、測定結果がよく示している。このように、それが極くわずかの量であっても、食用色素の中に、このような発癌物質が存在することは好ましくないと考えられるので、食用色素の中に染料中間体物質としてのアミンが残留しないことを法律で規定して純品をつくらせるか、さもなければ、このような油溶性色素は、他の欧米諸国の多くと同様に、使用許可からはずすことが望ましいと考える。著者らの実験では、色素が体内に入って代謝され、還元分解を受けて生じたアミンは、主として、aniline と $\bar{o}$ -toluidine およびその誘導体である。Hueper が 2-amino-1-naphthol (これは強い発癌物である)が還元分解産物として排泄されてくる可能性を論じているが、著者らの実験結果では、そのような可能性は認められな

った。しかし、不純物として含まれる β -naphthylamine が 300 ppm を越えるような色素を与えて実験すると、尿中にこの β -naphthylamine の代謝産物としての 2-amino-1-naphthol が、極めて微量ながら証明されることがあった。

結 語

1) 我国で許可されている食用色素の黄色2号と3号、即ち Yellow AB と OB について、その中に不純物として残存する、遊離の芳香族アミンについて検討したところ、 β -naphthylamine が、調査したすべての製品に含まれている。

2) これら色素の、体内で還元分解を受けた代謝産物としてのアミンは、aniline あるいは $\bar{o}$ -toluidine およびその誘導体が主である。

3) このような食用色素に対しては、不純物として原料の染料中間体物質が残存しないことを、きびしく規定するか、さもなければ、将来、その使用を中止することが望ましいと考えられる。

本論文の要旨は、第21回日本公衆衛生学会に於て講演発表した。

文 献

- 1) Hueper, W. C.: Carcinogens in the Human Environment, Arch. Pathol., 71, 237-267, 1961
- 2) Conway, W. D. and Lethco, E. J.: Aromatic Amine Impurities in Yellow AB and Yellow OB Food Dyes, Analyt. Chem., 32 (7), 838-841, 1960
- 3) Bratton, A. C. and Marshall, E. K.: Sulfanilamide Determination, J. Biol. Chem., 128, 537-550, 1939

(受付1964年12月5日)