Subsidiary Colors in Cosmetic Color Additives

佃井典子*, 古謝紀和*, 岡 恒*, 持田研秀*

Setsuko TSUKUI, Norikazu KOJA, Hisashi OKA, Kenshu MOCHIDA

This monograph discusses some problems of cosmetic coal-tar colors.

Tetrabromofluorescein, Lake Red C, Permanent Orange, Brilliant Lake Red R and Lithol Rubin B were found to be widely used in the lipsticks. In one sample of the lipsticks, Brilliant Fast Scarlet, non-permissible dye for use on mucous membrane.

Of the greatest importance in cosmetic colors are subsidiary dyes in the xanthene dyes as concomitants. With regard to dibromofluorescein, it contained often four brominated derivatives of fluorescein. The best method of their separation is by polyamide thin-layer chromatography.

As sulfonated sites were indefinite in Quinoline Yellow WS, it should be defined as disodium 2-(2'-quinolyl)-1, 3-indandione-5, 6'-disulfonate.

現在、化粧品に使用を許可されているタール色素¹⁾は83種類あり、発がん性および催奇性など人体にとって有害な色素は順次削除されているが、これら市販の化粧品用色素の中には付随色素をはじめとする夾雑物を混在する場合がしばしば見いだされ、色素の純度に関しいくつかの未解決の問題があることが示唆されている。

そこで、最も色素が多く用いられる口紅を試料に選び化粧品へのタール色素の使用状況を把握し、使用された色素の同定、付随色素の分離など純度に関する二、三の問題点について検討を行なった。

(1) 口紅中に使用される色素の種類について

口紅に使用が許可されている色素は、省令別表第一(医薬品、化粧品用色素)に属する11種類、別表第二(粘膜に使用する外用医薬品、化粧品用色素)に属する47種類の計58種類である。市販の口紅中の色素について1969年(43品目)、1970年(56品目)の2年にわたり、衛生試験法により調査した結果をFig-1に示した。なお、口紅から抽出した色素は、ろ紙クロマトグラフ法、薄層クロマトグラフ法、可視部吸収スペクトル法、赤外線吸収スペクトル法などにより同定した²⁾。

Tetrabromofluorescein が最も頻用されており、ついで

で Lake Red C, Permanent Orange, Brilliant Lake Red R, Lithol Rubin B などの順序で検出されている。

Fig-1 Dyes detected from Lipsticks in 1969 and 1970

* 国立衛生試験所大阪支所 大阪市東区法円坂町6
National Institute of Hygienic Science, Osaka
Branch (6 Hoensaka-machi, Higashiku, Osaka)

口紅に使用が禁止されている色素, すなわち粘膜に使用してはいけない色素としては, Brilliant Fast Scarlet が1試料から検出された。

(2) 夾雑する副色素について

一般に, Xanthene 系色素に副色素が多く見い出された。dibromofluoresceinを含む6試料中, 2例は主色素の他に tetrabromofluoresceinを検出し, 他の4例では主色素の他に fluorescein および tetrabromofluorescein を同時に検出した。これらの Xanthene 系色素は fluorescein をハロゲン化して製するため, ハロゲン数の異なる fluorescein, tetrabromofluorescein などの副色素を混入していたと考えられる。また, 市販のdibromofluorescein の中に fluorescein と tetrabromofluorescein の等量混合物よりなる偽称品の例を認めた。

これらのことより, Xanthene 系色素のうち, dibromofluorescein に純度の良くないものが認められた。

(3) Xanthene 系色素分離へのポリアミド薄層クロマトグラフィーの応用

ハロゲン置換した Xanthene 系色素は, ハロゲン置換数の異なる付随色素を夾雑することはすでに述べたが, それらの主色素と副色素の分離および確認に適した方法は見い出されていない。そこで, フェノールのブrom誘導体^{3,4)}をよく展開するポリアミド薄層クロマトグラフィーによって, 0~4個のブromを有する fluorescein を分離することを試みた⁵⁾。fluorescein のブrom誘導体の標品は Graichen ら⁶⁾の方法により合成し, 0~50% MeOH gradient のアンモニア水を用いるポリアミドカラムクロマトグラフィー (1.5×37cm) により精製を行った。各標品の吸収スペクトル, 蛍光スペクトル, ブrom含量を Table-1 に示した。

Fig-2 Correlation between Rf values and Methanol content in solvent systems

sample: I : fluorescein, II : 4-bromo-,
III : 4,5-dibromo-, IV : 2,4,5-tribromo-, V : 2,4,5,7-tetrabromo-fluorescein

a) ポリアミド薄層クロマトグラフィーによる分離

置換数の異なる bromofluorescein 標品 (I~V) を用いてポリアミド薄層による分離条件として, 展開溶媒に MeOH-NH₃-H₂O 混液を用いるとき, ブrom誘導体の Rf 値がブrom置換数の増加とともに減少する。これはブrom原子の—I効果によりオルト位のフェノール性—OH基とポリアミド—C=O 基との間の水素結合が強固になり, ブrom置換された fluorescein はより強くポリアミドに吸着されるためである。NH₃ 濃度が一定のときは, Fig-2 に示すように MeOH 濃度の増加に伴ないブrom置換数が多いほど Rf 値が増大する。これは bromofluorescein はブrom置換により水への溶解度が減少

Table-1 Identification of Bromofluoresceins

Fraction	Spectrometric data $\lambda_{\max}(\text{m}\mu)$	Fluorometric data		Bromine analysis	
		Excitation maxima(m μ)	Emission maxima(m μ)	Found (%)	Calcd. (%)
I	492	492	514	none	none
II	498	494	520	19.2	19.5
III	504	504	528	32.7	32.6
IV	512	512	533	41.6	42.1
V	518	518	538	49.3	49.3

I : fluorecein II : 4-bromofluorescein III : 4,5-dibromofluorescein
IV : 2,4,5-tribromoflurscein V : 2,4,5,7-tetrabromofluorescein

Fig-3 Correlation between Rf values and Ammonia content in solvent systems

sample : I : fluorescein, II : 4-bromo-,
III : 4,5-dibromo-, IV : 2,4,5-tribromo-,
V : 2,4,5,7-tetrabromo-fluorecein

し、MeOHの添加により展開溶媒に溶けやすくなるため Rf 値が増大すると考えられる。

一方、Fig-3に示すように、MeOH濃度を一定とするときは、NH₃濃度の増加により Rf 値が増大する。すなわち、NH₃添加により bromofluorescein がキノイド構造をとるため溶媒への溶解度が増大し、NH₃無添加のときに比して Rf 値が大きくなる。

Bromofluorescein 誘導体は、MeOH-NH₃-H₂O(10 : 2 : 88)を展開溶媒として用いるとき最もよい分離像が得

Fig-4 Chromatogram of Fluorescein and Brominated Derivatives on Polyamide-layers

sample : each 5 μ g of I, II, III, IV, V and commercial dibromofluoresceins a, b, c and d

developing solvent : MeOH : NH₄OH : H₂O (10 : 2 : 88)

られ、それらの検出感度は 0.1~0.5 μ g であり、さらに紫外線照射下では 0.05 μ g でも充分検出できる。

b) 市販 dibromofluorescein の分離および定量

医薬品および化粧品用色素橙色 201 号として市販されている dibromofluorescein は合成副生物が付随色素としてしばしば検出される。市販品 4 試料 a, b, c, d についてポリアミド薄層クロマトグラフィーを行なうとき、Fig-4に示すように、いずれも主色素 4,5-dibromofluorescein の他に、fluorescein, 4-dromofluorescein, 2,4,5-tribromofluorescein および 2,4,5,7-tetrabromofluorescein の Rf 値と一致するスポットを確認した。

Table-2 Results of Assay of Commercial Samples of Dibromofluorescein by Fluorometry

commercial sample	Primary dye (%)	subsidiary dye (%)				total dye (%)
	4,5-dibromo-fluorescein	fluorescein	4-bromo-fluorescein	2,4,5-tribromo-fluorescein	2,4,5,7-tetra-bromofluorescein	
a	62.3	trace	14.5	10.7	7.4	94.9
	62.9	trace	14.9	10.0	7.8	95.6
b	74.4	1.9	13.6	6.3	1.6	97.8
	74.3	1.8	14.2	6.2	1.7	98.2
c	59.5	3.7	24.2	3.7	3.8	94.8
	57.8	3.8	25.2	3.9	4.3	95.0
d	59.2	1.0	13.4	10.1	13.2	97.4
	57.6	0.9	14.0	10.1	14.6	97.2

ついで、蛍光光度法により各ブロムフルオレセインの定量を行なったところ、Table-2に示すように主色素4, 5-dibromofluorescein 含量は57~74%を示し、規格に適合しないものが多い。

(4) キノリンイエロー WS のスルホン酸置換位置について

キノリンイエロー WS は化粧水、乳液等に繁用される2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione のスルホン酸誘導体

Fig-5 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione

2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione D & C Yellow No. 10	
25% Fuming H ₂ SO ₄	20°, 120min.
"	50°, 120min.
"	70°, 30min.
"	" 60min.
"	" 240min.
"	100°, 30min.
"	" 60min.
"	" 120min.

Fig-6 Thin-layer Chromatograms of Sulfonated Products of 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione on Cellulose MN300
Solvent systems: n-BuOH-Pyridine-1% Ammonia(6:3:4)

であるが、スルホン酸置換位置が明確にされておらず、ジスルホン酸のジナトリウム塩とのみ規定されている¹⁾ため、市販品の品質は一定ではなく、多くのスルホン酸誘導体を夾雑する。

そこで、キノリンイエロー WS の標準品の製造と市販品の品質を確保するためには、スルホン酸誘導体の置換位置を決定する²⁾ことが重要である。

キノリンイエロー WS 合成の常法により、2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione を発煙硫酸によりスルホン化するとき、Fig-6 の薄層クロマトグラムに示すように、反応条件により生成物が異なり主として Product I および II を生成する。

a) 各スルホン化体の構造解析について

Product I は中性水溶液中で 412m μ に吸収極大を有し(Fig-7)、その S 含量は 8.93% (理論値: モノスルホン酸として 9.07%) を示すモノスルホン酸誘導体である。つぎに、Product I の核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを測定し、スルホン酸基の置換位置の解析を行なった。Fig-8 に示すように、 δ 7.61(4H, singlet) のピークは隣接する 4 個のベンゼンプロトン、 δ 8.48(2H, singlet) および δ 7.93(H, singlet) のピークはそれぞれキノリン核の 7', 8' 位および 5' 位のプロトンに帰属される。また、 δ 8.03, 8.20 の 1 対の doublet(J=1.0cps) はそれぞれキノリン核の 3', 4' 位のプロトンに帰属される。しかし、スルホン酸基が置換されていない 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione は重クロロホルム中で 3', 4' 位のスピ

Fig-7 Absorption Spectra of Sulfonated Products I and II

Fig-8 Nuclear Magnetic Resonance Spectrum of 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-6'-sulfonic acid in DMSO-d₆

ン結合定数が 9.4cps であるのに対して、強い電子吸引基であるスルホン酸基の置換により 3',4' 位の電子密度が小さくなるためスピン結合定数が減少すると考えられる。モノスルホン化体の10個のプロトンのうち、残る1

個のメチン基のプロトンは帰属されないが、すでにMannukian ら^{8,9)} はキノリン核のNとインダンジオン核のC=Oの間に分子内水素結合を形成する (Fig-5) と述べており、プロトンが溶媒に固定されずに分子内を移動するためにシグナルが幅広くなり固有の chemical shift を認めない。

つぎに、赤外線吸収 (IR) スペクトルは、Fig-9 に示すように、分子内水素結合による $\nu_{C=O}$ の 1620cm^{-1} への低波数シフト、 1025cm^{-1} に $\tau_{SO\text{sym}}$ に基づく強い吸収、ベンゼン核 (δ_{CH} 760, 830, 875cm^{-1}) の吸収を示した。また、Product I は Ritchie ら¹⁰⁾ が p-aminobenzenesulfonic acid から Doebner-Miller 合成した 2-methyl quinoline-6-sulfonic acid と phthalic anhydride とを熱縮合して合成した標品の IR スペクトルとよく一致した。つぎに、Product I の質量スペクトルは Fig-10 に示すように、分子イオンピーク (M^+) $m/e353$ は比較的弱く、 SO_3 が脱離した $m/e273(M^+-80)$ が基準ピークを与える。NMR, IR, Mass の結果より、Product I は分子量 353 で、キノリン核の 6' 位がモノ置換された 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-6'-sulfonic acid と同定される。

つぎに、Product II のスルホン酸基置換位置につい

Fig-9 Infrared Spectra of Sulfonated Products I and II

Fig-10 Mass Spectrum of 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-6'-sulfonic acid

て検討した。Product II は水溶液中で 417m μ に吸収極大を有し (Fig-7), その S 含量は 14.8% (理論値: ジスルホン酸として 14.8%) を示すジスルホン酸誘導体である。Product II の NMR スペクトルは, Product I と比較してベンゼンプロトンのシグナルが δ 7.65 (2H, singlet), 7.55 (H, singlet) に新たに A₂B 系として認められたが, 他のプロトンは I と同様な chemical shift を示した。したがって, Product II はキノリン核の 6' 位とインダンジオン核の 5 位とがそれぞれスルホン酸基に置換した 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-5,6'-disulfonic acid と同定される。これを確かめるために Product II を塩酸酸性 KMnO₄ で分解するとき, 4-sulfophthalic acid と紫外外部吸収がよく一致した。すなわち, インダンジオン核の 5 位がスルホン酸基で置換されていることを支持する。ついで, Fig-9 に示すように, IR スペクトルは 1030, 1065cm⁻¹ に $\nu_{SO_{3H}}$ に基づく強い吸収, ベンゼン環の吸収 (δ_{CH} 840, 900cm⁻¹) を有し, Product II が 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-5,6'-disulfonic acid であるとして矛盾しない。

b) 市販キノリンイエローの WS 分析

市販のキノリンイエロー WS5 試料を薄層クロマトグラフィーにより分離した結果を Fig-11 に示した。試料 a~e はいずれも Rf0.47 に主スポットを与え, 他に Rf 0.72, 0.53, 0.39, 0.31 にそれぞれスポットを認めた。これは 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione を異った条件でスルホン化した生成物のパターンとよく類似している。したがって, 黄色 203 号として市販されているキノリン

Fig-11 Chromatograms of Commercial Samples of Quinoline Yellow WS on Cellulose MN300 layers

I : 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-6'-sulfonic acid

II : 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-5,6'-disulfonic acid

a~e : commercial samples of quinoline yellow WS

solvent system : n-BuOH-Pyridine-1 % Ammonia (6 : 3 : 4)

イエロー WS の主色素は 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-5,6'-disulfonic acid のジナトリウム塩であり, 製造の際のスルホン化条件の違いにより種々の副色素を夾

雑するものと考えられる。

ま と め

化粧品用色素の試験を実施するにあたり、市販品の口紅を中心に色素の使用状況を調査し、そこから導き出された二、三の問題点として付随色素の検討を行なった。

すなわち、夾雑する付随色素が多いといわれているジブロムフルオレセイン、キノリンイエローWSをとりあげ、分離確認法の改良を行なった。

市販のキノリンイエローWSの主の色素は 2-(2'-quinolyl)-1,3-indandione-5,6'-disulfonic acid であり、付随色素としてスルホン酸基の置換数の異なる副生物を含んでいることが認められた。

謝 辞

終りにのぞみ本研究の発表の機会を与えてくださった国立衛生試験所大阪支所朝比奈晴世支所長に深謝します。
(昭和48年1月19日受理)

文 献

1) “医薬品等に使用することができるタール色素を定

める省令”(昭和41年厚生省令第30号)

“医薬品等に使用することができるタール色素を定める省令の一部を改正する省令”(昭和47年厚生省令第55号)

- 2) 持田研秀, 古謝紀和, 佃井典子: 衛生試験所報告, **89**, 158 (1971)
- 3) 井上博之, 十倉一也, 荒木百合子: 薬誌, **87**, 88 (1967)
- 4) 井上博之, 上田伸一, 荒木百合子, 清水弘也: 薬誌 **87**, 109 (1967)
- 5) 佃井典子, 持田研秀: 衛生化学 **18** 103 (1972)
- 6) Graichen, C., Molitol, J. C.: J. Ass. Off. Agric. Chem., **42**, 149 (1959)
- 7) 佃井典子, 持田研秀: 衛生化学, **18** 320 (1972)
- 8) Manukian, B. K., Niklaus, P., Ehram, H.: Helv. chim. Acta, **52**, 1259 (1969)
- 9) Kehrer, F., Niklaus, P., Manukian, B. K.: ibid., **50**, 2200 (1967)
- 10) Ritchie, C. D., Wenninger, J. A., Jones, J. H.: J. Ass. Off. Agric. Chem., **44**, 733 (1961)