

報 文

高速液体クロマトグラフィーによる化粧品用タール色素の分析*

大西重樹, 西島 靖**, 木嶋敬二, 狩野静雄, 外村正治***

(1976年1月8日受理)

ポリビニルアセテート系ポーラスポリマー (TSK GEL LS-140), ポリスチレンジビニルベンゼンにスルホン基を導入した陽イオン交換樹脂 (TSK GEL LS-212, LS-213) 及びペリキュラー型陰イオン交換樹脂 (Vydac AX) を固定相に用いる高速液体クロマトグラフィーによる化粧品用タール色素の分析条件について検討した。

TSK GEL LS-140 を固定相とし, (酢酸+トリエチルアミン)/メタノールを移動相とするときアゾ系あるいはキサンテン系色素の分離が, TSK GEL LS-212, LS-213 を固定相とし, 酸性メタノールを移動相とするときキサンテン系色素の分離が, 又, Vydac AX を固定相とし, (ホウ酸ナトリウム+過塩素酸ナトリウム)/水を移動相とするときアゾ系あるいはブロムフルオレセインの分離が可能であった。

1 緒 言

従来, 色素の分析に関しては数多くの研究が行われており, その方法は薄層クロマトグラフィー (TLC) をはじめペーパークロマトグラフィー (PPC), カラムクロマトグラフィー (CC) 及びガスクロマトグラフィー (GC) などのクロマトグラフィーの外にポーラログラフィー, 核磁気共鳴法あるいは二波長測光法など多岐にわたっている。しかしながら TLC, PPC 及び CC などのクロマトグラフィーは分析時間が長く, 一般に定量精度も低いのが常である。又, GC 法はアントラキノン系色素の分析¹⁾²⁾, あるいは色素中間体や色素中の不純物の分離定量³⁾⁴⁾に利用されて良い結果を得ているが, 色素そのものへの応用は一般に色素が高分子量であり, 蒸気圧が低く, 熱に対して不安定であるという理由によって必ずしも適切な方法とはいえない。クロマトグラフィー以外の方法は数種類の色素が共存する場合には分析困難である。

ところで, 近年高性能充てん剤あるいは装置の開発によって発展してきた高速液体クロマトグラフィー (HLC) は, その性質上色素分析に適していると考えられる。既

に HLC を用いた食用色素中の不純物の分離定量⁵⁾⁶⁾ あるいは各種クロマトグラフィーによるアゾ, アントラキノン, 更にスルホネート色素の分離⁷⁾ が報告されているが, 一般に我が国において許可されている化粧品用タール色素の分析例は見当たらない。

著者らは各種の分離様式を利用した HLC による化粧品用品タール色素の分離の可能性を追求することを目的として種々検討した結果, 相互分離の可能性を見いだしたので, ここに検討した結果をまとめて報告する。

2 実 験

2.1 装置及び試薬

2.1.1 装置 日立 635 型液体クロマトグラフ及び東洋曹達 HLC 802 型を使用した。クロマト管はステンレス製 (4 mm I. D. × 60 cm 及び 2.1 mm I. D. × 50 cm) あるいはガラス製 (5 mm I. D. × 50 cm, 5 mm I. D. × 30 cm 及び 3 mm I. D. × 50 cm) を使用した。

2.1.2 試薬 溶離液に用いた試薬はすべて和光純薬製試薬特級品をそのまま用いた。

2.2 カラム充てん剤

ポリビニルアセテート系ポーラスポリマー (東洋曹達製 TSK GEL LS-140), ポリスチレンジビニルベンゼン系ポーラスポリマーにスルホン基を導入した陽イオン交換樹脂 (TSK GEL LS-212, LS-213) 及びペリキュ

* 化粧品用タール色素のクロマトグラフィーによる分析 (第1報)

** 鐘紡(株)化粧品研究所: 神奈川県小田原市寿町 5-3-28

*** 国立衛生試験所: 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

ラー型陰イオン交換樹脂 (Vydac AX) を使用した。カラムへの充てんは湿式法を用いて行った。

2.3 試料

分析に供した色素を Table 1 に示す。いずれも発己化成(株)より入手した。ブROMフルオレセインは混合物をポリアミドカラムクロマトグラフィー³⁾により分離し、可視吸収スペクトル及び質量分析によりブROM数の確認をした後標準品として使用した。なお、モノ-及びトリブROMフルオレセインは化粧品用ではないが、本実験においては同時に検討した。他の色素はそのまま用いた。

Table 1 Dyes used in this experiment

Type	Dye	Color No. (Japan)	Color Index No.
Azo	Amaranth	Red No. 2	16185
	New Coccine	Red No. 102	16255
	Tartrazine	Yellow No. 4	19140
	Sunset Yellow FCF	Yellow No. 5	15985
	Fast Acid Magenta	Red No. 227	17200
	Orange II	Orange No. 205	15510
Xanthene	Erythrosine	Red No. 3	45430
	Phloxine B	Red No. 104 (1)	45410
	Rose Bengal	Red No. 105 (1)	45440
	Acid Red	Red No. 106	45100
	Eosine YS	Red No. 230 (1)	45380
Imine	Brilliant Blue FCF	Blue No. 1	42090
Indigotine	Indigo Carmine	Blue No. 2	73015
Fluorane	Fluorescein	Yellow No. 201	45350
	Monobromofluorescein		
	Dibromofluorescein	Orange No. 201	45370
	Tetrabromofluorescein	Red No. 223	45380

2.4 実験操作

温度は室温 (24~27)°C で行った。試料は 1% メタノール色素液 (0.5~5.0)µl をマイクロシリンジでセプタムを通じてカラムに直接注入した。その他の条件はクロマトグラムに記載した。

3 結果及び考察

3.1 TSK GEL LS-140 による分離条件の検討

水溶性色素 13 点の LS-140 に対する溶出挙動について詳細に検討した。試料色素はすべて陰イオンであると考えられることから pH の影響があると考え、酸として酢酸を、アルカリとしてトリエチルアミン (TEA) をメタノールに添加したときの影響について調べた。一般に酢酸酸性メタノールでは溶出が遅くなり、0.001% 以上の濃度では一部の色素を除き溶出しにくい。これに対して TEA/メタノールでは早く溶出されるが相互分離が困難であることから 0.1% 酢酸/メタノールと 0.1% TEA/メタノールを混合した系について検討した。アゾ、インジゴチン及びイミンは酸性溶媒が多いところで保持

時間 (t_R) は近接するがピークの形状はシャープであった。そこで溶離液の流速を小さくし、検出器の感度を上げ、試料量を少なくしたところ分離可能となった。Fig. 1 にクロマトグラムを示した。キサンテン系色素は酸性溶媒が多いところで相互に t_R が大きく異なるので分離可能ではあるが、ピークの形状はブロードとなり感度の低下あるいは分離に長時間を要することから実際的でない。一方、アルカリ性溶媒の多いところで t_R は近接するがピークの形状はシャープとなることから溶媒の混合比を酢酸/メタノール 1 部、TEA/メタノール 10 部に固定し、酸及びアルカリ濃度を各々 (1~3)% と変化した結果、1% が最も良好な分離を示した。2% 及び 3% では赤色 3 号と赤色 105 号が分離しなかった。Fig. 2 (a) に 1%, Fig. 2 (b) に 2% 添加したときのクロマトグラムを示した。なお、アゾ系色素 2 点についても同時に分析した。骨格構造が同一で置換基の位置が異なる赤色 2 号と赤色 102 号は第 1 液に 0.001% 酢酸/メタノールを、第 2 液に 0.001% TEA/メタノールを用いる段階溶離法によって分離しうる。なお、他の溶離液として水/メタノール、*n*-ヘキサン/メタノールについて検討した結果、水の影響はなかった。一方、非極性溶媒である *n*-ヘキサンの影響として溶出が遅れ t_R に差が生じたがピークの形状がブロードとなり多成分の分離は困難で

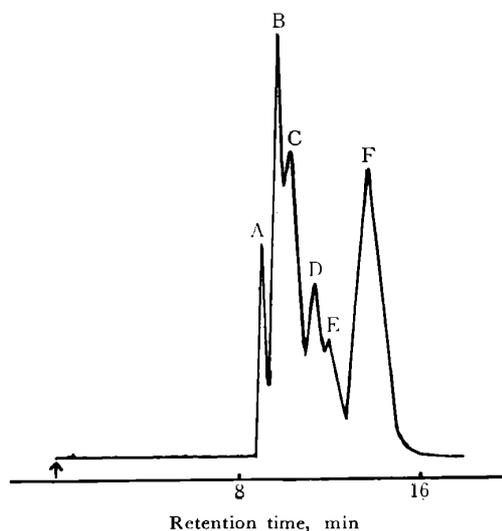


Fig. 1 Chromatogram of azo, indigotin and imine type dyes

A: Brilliant Blue FCF; B: Sunset Yellow FCF; C: Indigo Carmine; D: Fast Acid Magenta; E: Impurity; F: Orange II; Column: TSK GEL LS-140 (4 mm I. D. × 60 cm); Eluent—0.1% acetic acid/methanol: 0.1% triethylamine/methanol (9:1); Flow rate: 0.5 ml/min; Detector: UV photometer (254 nm); Sens.: 0.16 AUFS; Sample size: 3 µl; Column temp.: Ambient

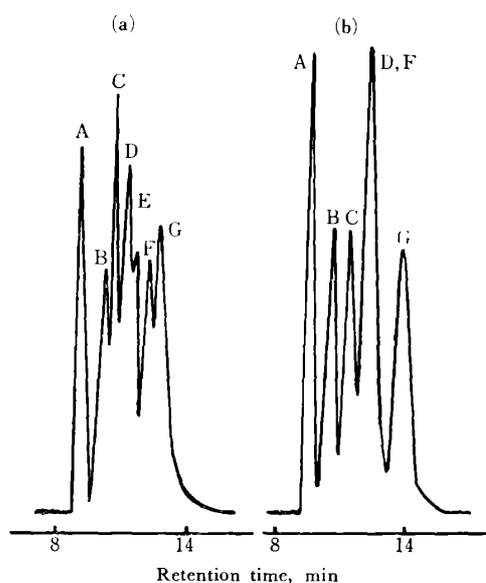


Fig. 2 Chromatograms of azo and xanthene type dyes

A: Ammaranth; B: Acid Red; C: Phloxine B; D: Rose Bengal; E: Impurity; F: Erythrosine; G: Orange II; Column: TSK GEL LS-140 (4 mm I. D. × 60 cm); Eluent—(a) 1% triethylamine/methanol: 1% acetic acid/methanol (10:1), (b) 2% triethylamine/methanol: 2% acetic acid/methanol (10:1); Flow rate: 0.5 ml/min; Detector: UV photometer (254 nm)

あった。溶出が遅れる原因は色素の溶離液に対する溶解度の減少によるものと考えられる。

3.2 Vydac AX による分離条件の検討

3.2.1 水溶性色素 溶離液として各種の塩溶液を検討した結果、(ホウ酸ナトリウム+過塩素酸ナトリウム)/水を用いることによって水溶性色素5点の溶出分離が可能であった。Fig. 3 (a) に LS-140 では比較的分離が困難であった黄色4号, 赤色2号及び黄色5号の分離例を示した。又, Fig. 3 (b) には第1液に 0.01 M ホウ酸ナトリウム/水を, 第2液に (0.01 M ホウ酸ナトリウム+1.0 M 過塩素酸ナトリウム)/水を用いる直線的こう配溶出法を行った黄色4号, 青色2号, 赤色2号, 黄色5号及び赤色227号のクロマトグラムを示した。他の色素については赤色102号が赤色2号と同位置に溶出するのを除き, 同条件では溶出されなかった。又, 1.0 M 塩化ナトリウム/水を溶離液として用いても溶出されなかったが, これは色素の極性が大きく充てん剤のイオン交換基に強く吸着されるためであると考えられる。他方, ポリスチレンジビニルベンゼン系ポーラスポリマーに4級アンモニウム基を導入した陰イオン交換樹脂を用いて

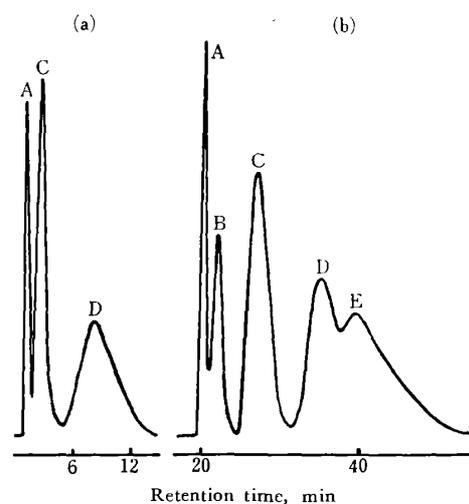


Fig. 3 Chromatograms of azo and indigotin type dyes

A: Tartrazine; B: Indigo Carmine; C: Ammaranth; D: Sunset Yellow FCF; E: Fast Acid Magenta; Column: Vydac AX (2.1 mm I. D. × 50 cm); Eluent—(a) 0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ +0.5 M NaClO_4 , (b) primary solvent: 0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$, secondary solvent: 0.01 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ +1.0 M NaClO_4 ; Flow rate: 1.0 ml/min; Detector: UV photometer (254 nm)

種々検討したがすべての色素が吸着されて溶出しな。これに対して紫外部に大きな吸収スペクトルを有するために UV 検出器の使用は一般に困難であると考えられるが, ベンゼンをメタノールに加えるとき一部の色素が溶出されること, あるいはペリキュラー型陰イオン交換樹脂で5色素が分離溶出される事実を考え合わせると, 充てん剤のイオン交換基に強く吸着されるだけでなく, スチレン骨格に対する吸着が起こっているためであると思われる。

3.2.2 ブロム置換フルオレセイン ブロム置換フルオレセインはキサントン系の水溶性色素に比べ酸性度が低いため, 3.2.1 と同様の条件で分離される。Fig. 4 (a) に直線的こう配溶出法によるクロマトグラムを示した。溶出順序はフルオレセイン, モノブロム-, ジブロム-, トリブロム- 及びテトラブロムフルオレセインで酸性度の低い物質の順に溶出される。一方, こう配溶出法を行わない場合のクロマトグラムを Fig. 4 (b) に示したがフルオレセインとモノブロムフルオレセインを完全分離しうる条件ではトリブロム及びテトラブロムフルオレセインは溶出が困難であった。

3.3 TSK GEL LS-212, LS-213 による分離条件の検討

3.3.1 水溶性色素 3.2.1 で述べたようにポーラス

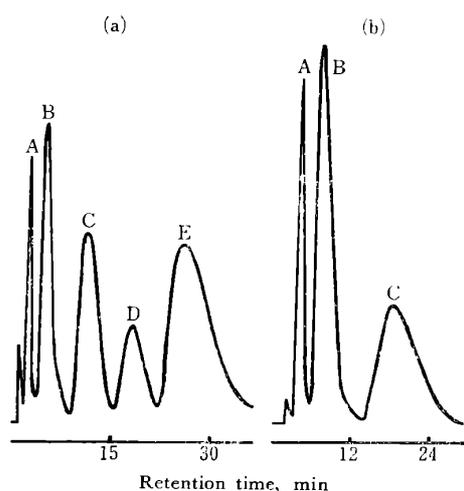


Fig. 4 Chromatograms of bromosubstituted fluoresceins

A: Fluorescein; B: Monobromofluorescein; C: Dibromofluorescein; D: Tribromofluorescein; E: Tetrabromofluorescein; Column: Vydac AX (2.1 mm I.D. \times 50 cm); Eluent—(a) primary solvent: 0.001 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 0.1$ M NaClO_4 (4 min), secondary solvent: 1.0 M NaClO_4 , (b) 0.002 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 + 0.2$ M NaClO_4 ; Flow rate: 1.0 ml/min; Detector: UV photometer (254 nm)

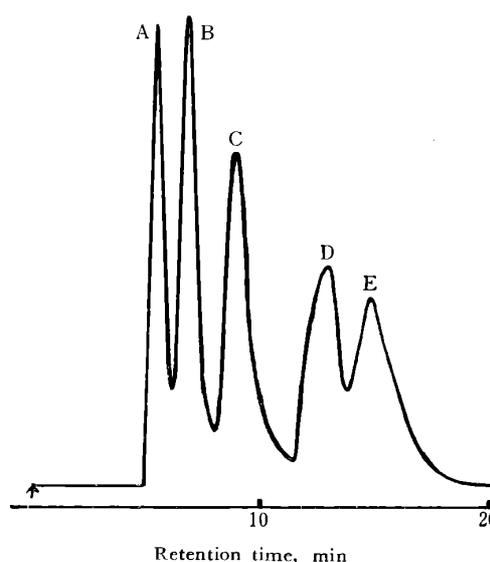


Fig. 5 Chromatogram of azo and xanthene type dyes

A: Amaranth; B: Acid Red; C: Orange II; D: Eosine YS; E: Erythrosine; Column: TSK GEL LS-212 (5 mm I.D. \times 30 cm); Eluent: 0.05% sulfuric acid/methanol; Flow rate: 0.5 ml/min; Detector: Vis photometer (500 nm)

型陰イオン交換樹脂では充てん剤に色素が吸着されることから、ポリスチレンジビニルベンゼン系ポラスポリマーにスルホン基を導入した陽イオン交換樹脂を充てん剤に用いて検討した。溶離液に酸性メタノールを用いるときイオン交換基はH型となり色素のイオン交換基に対する吸着は起こらないため分離溶出される。Fig. 5 にクロマトグラムを示したが同条件では赤色2号の溶出位置にとう色205号を除く他のアゾ系あるいはインジゴチン、イミンが溶出される。一方キサンテン系色素はこの外に赤色3号、赤色104号及び赤色230号あるいは赤色105号、赤色106号及び赤色230号などの相互分離が可能である。なお、酸の種類について硫酸、リン酸、酢酸及び過塩素酸の各々0.05%メタノール溶液について検討したところ、装置に対しては好ましくないが硫酸が比較的良好な結果を示した。分離機構については別途報告の予定であるが、吸着及びイオン排除効果によるものと考えられる。

3.3.2 ブロム置換フルオレセイン 水溶性色素と同様に、溶離液として前記4種の酸性メタノールを用いるとき、テトラブロムフルオレセインは約(4~6)分、トリブロムフルオレセインは約(7~9)分、ジブロムフルオレセインは約(13~14)分、そしてモノブロムフルオレセインは約(30~40)分で溶出され、酸の種類による大きな影響は認められなかった。又、0.05%リン酸/メ

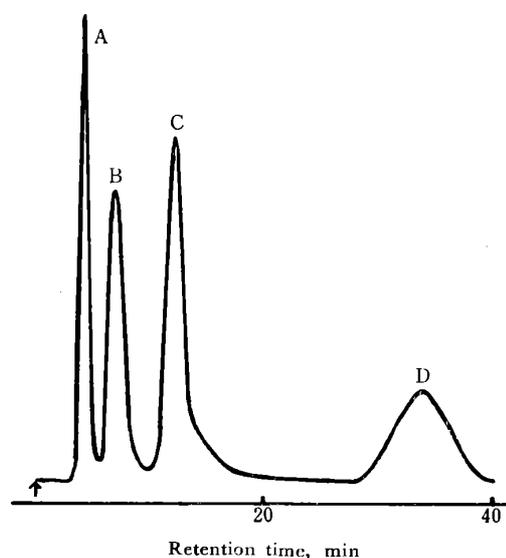


Fig. 6 Chromatogram of bromofluoresceins

A: Tetrabromofluorescein; B: Tribromofluorescein; C: Dibromofluorescein; D: Monobromofluorescein; Column: TSK GEL LS-213 (5 mm I.D. \times 50 cm); Eluent: Methanol; Flow rate: 1.0 ml/min; Detector: UV photometer (254 nm)

タノールで充てん剤をH型とした後酸を含まないメタノールを溶離液とするとき、 t_R は各々(1~5)分程度早くなる。これは色素の溶離液に対する溶解度が増すためであると考えられる。Fig. 6 にクロマトグラムを示したが、

同条件ではブロム化されていないフルオレセインが溶出されない。従って、Vydac AX を併用することによりブロム置換フルオレセイン混合物の相互分離が可能である。

4 結 語

高速液体クロマトグラフィーを用いて化粧品用タール色素の分析条件について検討した。その結果、水溶性色素 13 点 (うち食用色素 10 点) 及びブロム置換フルオレセイン 5 点の相互分離が可能となった。

本法は従来色素分析に用いられてきた TLC, PPC, GC 及び CC に比較し、短時間で分析が可能であり、今後更に各色素の分離度の向上あるいはより多種類の色素の分離条件の検討を行うことにより食品、化粧品あるいは医薬品中の色素の確認更には定量の可能性があり、今後大いに期待の持てる方法である。

終わりに、本研究の発表を許可された鐘紡株式会社常務取締役化粧品研究所長二子石広猛氏に深謝の意を表します。又、本研究を行うに当たり有益な御助言をいただいた東京大学生産技術研究所高井信治博士に対し厚く感謝致します。

(1975年10月17日, 日本化学会第33秋期年会講演)

文 献

- 1) T. Furuya, S. Shibata, H. Iizuku : *J. Chromatogr.*, **21**, 116 (1966).
- 2) J. B. Terrill, E. S. Jacobs : *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 604 (1970).
- 3) 外村正治, 小幡利勝, 狩野静雄, 村松ひろみ, 南城 実, 荒木常子, 志賀拓夫, 石田達也: 衛生試験所報告, **89**, 112 (1971).
- 4) B. L. Kabacoff, G. More, C. M. Fairchild: *J. of the Society of Cosmetic Chemist*, **24**, 551 (1973).
- 5) M. Singh : *J. Ass. Offic. Anal. Chem.*, **57**, 219, 358 (1974) ; **58**, 48 (1975).
- 6) J. E. Bailey, E. A. Cox : *ibid.*, **58**, 609 (1975).

- 7) R. J. Passarelli, E. S. Jacobs : *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 153 (1975).
- 8) 佃井典子, 持田研秀: 衛生化学, **18**, 103(1972).

☆

Separation of tar dyes for cosmetic products by high-speed liquid chromatography. Shigeki OHNISHI, Yasushi NISHIJIMA*, Keiji KIJIMA, Shizuo KANO and Masaharu TONOMURA** (*Kanebo Ltd., Cosmetic Laboratory, 5-3-28, Kotobuki-cho, Odawara-shi, Kanagawa; **National Institute of Hygienic Sciences, 1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo)

Azo and xanthene type water soluble dyes were separated on a TSK GEL LS-140 (polyvinylacetate porous polymer) column by elution with methanol containing acetic acid and triethylamine. Above all, five dyes of them {Tartrazine, Color Index (C.I.) No. 19140; Indigocarmine, C.I. No. 73015; Amaranth, C.I. No. 16185; Sunset yellow FCF, C.I. No. 15985 and Fast acid magenta, C.I. No. 17200} were also separated on a column packed with Vydac AX (pellicular type anion exchange resin) by using linear gradient technique, primary solvent of which was 0.01 M sodium borate aqueous solution and secondary solvent was the mixture of 0.01 M sodium borate and 1.0 M sodium perchlorate aqueous solution. Fluorescein, monobromofluorescein, dibromofluorescein, tribromofluorescein, and tetrabromofluorescein were separated by this method. More over, the separation of bromo substituted fluorescein dyes mentioned above and the water soluble xanthene type dyes was achieved on a TSK GEL LS-212, LS-213 (sulfonated styrenedivinylbenzene porous polymer type cation exchange resin) by acidic methanol eluent.

(Received Jan. 8, 1976)

Keywords

Bromofluorescein
High-speed liquid chromatography
Water soluble tar dye