

日本化粧品工業連合会 技術資料No. 85 「第9回化粧品技術
情報交流会議テキスト」(昭和63年11月29日)より抜粋

(下記は、黄色5号、赤色502号、赤色503号、だいたい色2
05号、だいたい色402号、赤色201号、赤色202号、赤
色203号、赤色204号、赤色205号、赤色219号、赤色
221号、赤色228号、赤色405号、赤色225号、赤色5
01号、赤色505号及びだいたい色403号への適用を想定し
て作られた分析法です。本件については、日本化粧品工業連合会
技術委員会色素専門部会において見直しをすることになっていま
す。)

3.9 1-フェニルアゾ-2-ナフトール試験法

1-フェニルアゾ-2-ナフトール試験法とは、1-フェニルアゾ-
2-ナフトールの混在の可能性のあるタール色素中に混在する1-フェ

ニルアゾー 2 - ナフトール含量を高速液体クロマトグラフ法により試験する方法である。

装置・器具

高速液体クロマトグラフ

カラム：内径 4 ~ 6 mm、長さ 10 ~ 30 cm のステンレス管に 5 ~ 10 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲル又はオクタデシルシリコン被覆シリカゲルを充てんしたもの、前処理用カートリッジ

操作法

第 1 法（水溶性色素 - 1）

試料約 0.1 g を精密に量り、水 20 ml を用いて分液漏斗に移す。これにクロロホルム 25 ml を加えて 5 分間振り混ぜる。静置後、クロロホルム層を分取する。水層にクロロホルム 20 ml ずつを加え、同様に操作を 2 回繰り返す。クロロホルム層を合わせロータリーエバポレーター (40°) で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0 ml を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第 2 法（水溶性色素 - 2）

試料約 0.1 g を精密に量り、水 20 ml を用いて分液漏斗に移す。これに四塩化炭素 25 ml を加えて 5 分間振り混ぜる。静置後、四塩化炭素層を分取する。水層に四塩化炭素 10 ml ずつを加え、同様な操作を 2 回繰り返す。四塩化炭素層を合わせロータリーエバポレーター (40°) で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0 ml を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第 3 法（顔料）

試料 0.1 g を精密に量り、硫酸及びジメチルホルムアミドの混液 (1 : 99) 20 ml を加えて十分かき混ぜた後、水 100 ml を加えて静置し、沈殿を析出させる。これを遠心分離 (3000 rpm、10 分間) し、上澄

液をろ過（No. 5 C）する。沈殿に硫酸及びジメチルホルムアミドの混液（1：99）5 ml 及び水 25ml を加えてかき混ぜ、再び遠心分離（3000 rpm、10 分間）し、同様に操作を繰り返す。ろ液を先のろ液に合わせ、前処理用カートリッジ（流速：10～20ml/min）に通した後、水 25ml を通し洗浄する。次いでアセトン 15ml を流し、アセトン溶出液をロータリーエバポレーター（40°）で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0ml を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第 4 法（油溶性色素 - 1）

試料 0.1 g を精密に量り、クロロホルム 5 ml を加え加温して溶かす。次いでメタノール 45 ml を加え 10～20 分間放置し、不溶物を析出させ、これを遠心分離（3000 rpm、10 分間）する。上澄液を別に移し、沈殿にメタノール 20ml を加えてかき混ぜた後、再び遠心分離（3000 rpm、10 分間）する。上澄液を先の上澄液に合わせロータリーエバポレーター（40°）で減圧乾固する。残留物にメタノールを加えて溶かし正確に 50ml とし試験溶液とする。ただし、不溶物がある場合、これをろ過する。

第 5 法（油溶性色素 - 2）

試料 0.1 g を精密に量り、クロロホルム 1ml を加えて溶かし、更にメタノールを加えて正確に 50ml とし試験溶液とする。

試験方法

試験溶液 20 μ l につき、次の条件の液体クロマトグラフ法により試験を行う。1-フェニルアゾ-2-ナフトールのピーク高さ又はピーク面積を測定し、別に作成した検量線から試験溶液中の 1-フェニルアゾ-2-ナフトール濃度を求めた後、試料中の 1-フェニルアゾ-2-ナフトール含量を算出する。

高速液体クロマトグラフ測定条件

カラム：内径 4～6 mm、長さ 10～30 cm のステンレス管に 5～10 μ m

のオクタデシルシリル化シリカゲル又はオクタデシルシリ
コン被覆シリカゲルを充てんしたもの

カラム温度：室温又は 40°

移動相：メタノール及び水の混液（80：20 又は 85：15）

流速：1.0 ml/min

検出器：可視吸光光度計（測定波長、480nm）又は紫外吸光光度計
（測定波長、230nm）

検量線の作成法

検量線用 1-フェニルアゾ-2-ナフトール標準溶液各々 20 μ l を試
験溶液と同様の液体クロマトグラフ条件で測定し、横軸に 1-フェニル
アゾ-2-ナフトールの濃度を、縦軸にピーク高さ又はピーク面積をと
り、検量線を作成する。

法定色素 ハンドブック

改訂版

日本化粧品工業連合会 編

薬事日報社

[参考2]

1-フェニルアゾ-2-ナフトール試験法

1-フェニルアゾ-2-ナフトール試験法とは、1-フェニルアゾ-2-ナフトールの混在の可能性があるタール色素中に混在する1-フェニルアゾ-2-ナフトール含量を、高速液体クロマトグラフ法により試験する方法である（注1）。

装置・器具

高速液体クロマトグラフ

カラム：内径 4～6 mm、長さ 10～30 cm のステンレス管に 5～10 μm のオクタデシルシリル化シリカゲル又はオクタデシルシリコーン被覆シリカゲルを充てんしたもの（注2）、前処理用カートリッジ（注3）

操作法

第1法（水溶性色素-1）

試料約 0.1 g を精密に量り、水 20 mL を用いて分液漏斗に移す。これにクロロホルム 25 mL を加えて5分間振り混ぜる。静置後、クロロホルム層を分取する。水層にクロロホルム 20 mL ずつを加え、同様に操作を2回繰り返す。クロロホルム層を合わせロータリーエバポレーター（40℃）で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0 mL を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第2法（水溶性色素-2）

試料約 0.1 g を精密に量り、水 20 mL を用いて分液漏斗に移す。これに四塩化炭素 25 mL を加えて5分間振り混ぜる。静置後、四塩化炭素層を分取する。水層に四塩化炭素 10 mL ずつを加え、同様な操作を2回繰り返す。四塩化炭素層を合わせロータリーエバポレーター（40℃）で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0 mL を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第3法（顔料）

試料約 0.1 g を精密に量り、硫酸及びジメチルホルムアミドの混液（1：99）（注4）20 mL を加えて十分かき混ぜた後、水 100 mL を加えて静置し、沈殿を析出させる。これを遠心分離（毎分3000回転、10分間）し、上澄液をろ過（No. 5C）する。沈殿に硫酸及びジメチルホルムアミドの混液（1：99）5 mL 及び水 25 mL を加えてかき混ぜ、再び遠心分離（毎分3000回転、10分間）し、同様に操作を繰り返す。ろ液を先のろ液に合わせ、前処理用カートリッジ（流速：10～20 mL/min）に通した後、水 25 mL を通し洗浄する。次いでアセトン 15 mL を流し、アセトン溶出液をロータリーエバポレーター（40℃）で減圧乾固する。残留物にメタノール 2.0 mL を正確に加えて溶かし、これを試験溶液とする。

第4法（油溶性色素-1）

試料約 0.1 g を精密に量り、クロロホルム 5 mL を加え加温して溶かす。次いでメタノール 45 mL を加え10～20分間放置し（注5）、不溶物を析出させ、これを遠心分離（毎分3000回転、10分間）する。上澄液を別に移し、沈殿にメタノール 20 mL を加えてかき混ぜた後、再び遠心分離（毎分3000回転、10分間）する。上澄液を先の上澄液に合わせロータリーエバポレーター（40℃）で減圧乾固する。残留物にメタノールを加えて溶かし正確に 50 mL とし試験溶液とする。ただ

し、不溶物がある場合、これをろ過する。

第5法（油溶性色素-2）

試料約 0.1 g を精密に量り、クロロホルム 1 mL を加えて溶かし、更にメタノールを加えて正確に 50 mL として試験溶液とする。

試験方法

試験溶液 20 μ L につき、次の条件の液体クロマトグラフ法により試験を行う。1-フェニルアゾ-2-ナフトールのピーク高さ又はピーク面積を測定し、別に作成した検量線から試験溶液中の1-フェニルアゾ-2-ナフトール濃度を求めた後、試料中の1-フェニルアゾ-2-ナフトール含量を算出する。

高速液体クロマトグラフ測定条件

カラム：内径 4～6 mm、長さ 10～30 cm のステンレス管に 5～10 μ m のオクタデシルシリル化シリカゲル又はオクタデシルシリコーン被覆シリカゲルを充てんしたもの

カラム温度：室温又は 40°C

移動相：メタノール及び水の混液（80：20 又は 85：15）

流速：1.0 mL/min（注6）

検出器：可視吸光度計（測定波長、480 nm）又は紫外吸光度計（測定波長、230 nm）

検量線の作成法

検量線用1-フェニルアゾ-2-ナフトール標準溶液各々 20 μ L を試験溶液と同様の液体クロマトグラフ条件で測定し、横軸に1-フェニルアゾ-2-ナフトールの濃度を、縦軸にピーク高さ又はピーク面積をとり、検量線を作成する。

〔注 解〕

本試験法は改訂前の法定色素ハンドブックに記載されていたが、参考のためにそのまま転載した。

1-フェニルアゾ-2-ナフトールは一般に Sudan I と呼ばれ、小塚ら及び小林らにより、黒皮症の発生に関与する可能性が高いことが報告されている。1-フェニルアゾ-2-ナフトールは図1のような構造を持ち、アニリンと β -ナフトールを出発原料とするタール色素の反応工程で往々に生じる副生成物である。このため、化粧品の安全性を確保するために、この種の反応系を用いる色素については1-フェニルアゾ-2-ナフトールの試験法とともに、参考限度値を設定した。

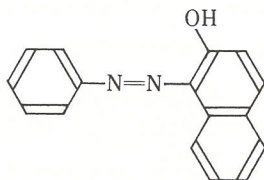


図1 1-フェニルアゾ-2-ナフトール

1-フェニルアゾ-2-ナフトールの定量法には吸収スペクトル法、高速液体クロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ法、ガスクロマトグラフ-質量スペクトル法等が報告されている。FDA のタール色素中の1-フェニルアゾ-2-ナフトールの試験法には吸収スペクトル法が採用されている。本法

では1-フェニルアゾ-2-ナフトールに対して、より選択性があると考えられる高速液体クロマトグラフ法を採用した。また、参考限度値は、1-フェニルアゾ-2-ナフトールによるアレルギー性接触皮膚炎に関する小塚らの報文及び、表1に示すアメリカにおけるFDAの規格値をもとに、構造式からみて1-フェニルアゾ-2-ナフトールの混在する可能性がある色素類に対して、通常、それらが化粧品に配合される量から試算した値に、現在化粧品用として市販されている色素の分析結果を加味して、水溶性、油性及び顔料に区分し、それぞれに定めたものである。

表1 FDAの1-フェニルアゾ-2-ナフトールの規格値

タール色素	規 格 値
黄色5号	10 ppm 以下
赤色225号	3 % 以下
赤色203号	50 ppm 以下
赤色204号	50 ppm 以下

試験法中の、前処理法の第1法は水溶性色素のうち、黄色5号、赤色502号および赤色503号を対象に適用する方法である。

第2法は水溶性色素のうち、だいたい色205号に適用する方法である。だいたい色205号は、第1法では抽出溶媒のクロロホルムと色素水溶液が乳化し二層に分離せず測定が難しくなるため、クロロホルムに比べ極性の小さい四塩化炭素を抽出溶媒に用いる。

第3法は顔料に硫酸・ジメチルホルムアミド混液を加え顔料を構成する色素部分を溶解する。これを前処理カートリッジに通し1-フェニルアゾ-2-ナフトールを前処理カートリッジに保持させる。水洗後、アセトンで1-フェニルアゾ-2-ナフトールを溶出させ、ロータリーエバポレーターでアセトンを留去した後、メタノールを加えて溶かし試験溶液とする。

第4法は油性色素にクロロホルムを加えて完全に溶解した後、メタノールを加えて色素本体を析出させる。これを遠心分離した後、上澄液を分取して、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した後、メタノールを加えて溶かし試験溶液とする。

第5法は、油性色素にクロロホルムを加えて完全に溶解した後、さらに溶離液の極性に近づけるためにメタノールを加えて試験溶液とする。

以上のように調製した試験溶液につき逆相分配カラムを用いた高速液体クロマトグラフにより1-フェニルアゾ-2-ナフトールのピーク面積を測定し、標準溶液で得た1-フェニルアゾ-2-ナフトールのピーク面積から検量線を作成し、色素中の1-フェニルアゾ-2-ナフトール含量を試験する。

1-フェニルアゾ-2-ナフトールは図2のような可視・紫外部での吸収スペクトルを持つ。このため、クロマトグラム上での選択性の面から480 nmが検出波長として最も好ましいが、可視部領域で使用可能な検出器が必ずしも普及していないため紫外部での測定波長(230 nm)を併記した。検出波長230 nmは感度は高いが、共存する他の成分も吸収を示す場合が多い波長域であるため、保持時間の近接する他の成分の妨害に留意する必要がある。

試験法の運用にあたって紫外部の検出器を用いて測定したとき、1-フェニルアゾ-2-ナフトールが基準値を超えるようであれば、可視部検出器付きの高速液体クロマトグラフで再測定を行うか、

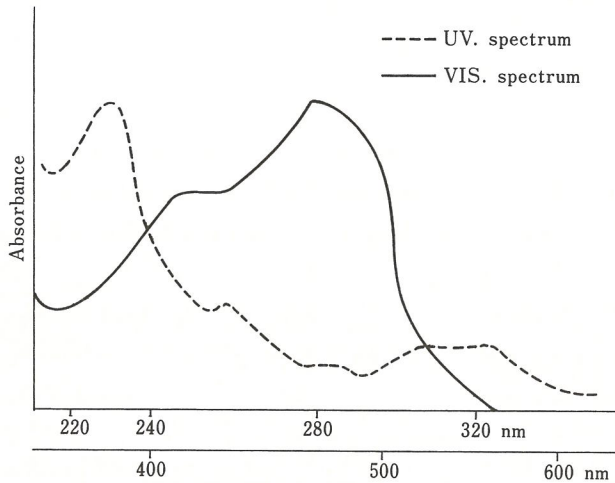


図2 1-フェニルアゾ-2-ナフトールのスペクトル (メタノール溶液)

ガスクロマトグラフ法等の他の分析手法で確認することが望ましい。

高速液体クロマトグラフ法の分離管にはシリカゲル表面をオクタデシルシラン (ODS) 処理した通称 ODS 系充填剤と呼ばれるものを用いている。この ODS 充填剤は、多くのメーカーから色々の商品名で売られている。これらは、基剤シリカの性状を含め、ODS 化に用いるシラン化剤の種類、量、反応条件等が微妙に異なり、さらに ODS 化後に残るシラノール基の処理の有無、処理試薬の種類、処理条件等も異なり、微妙な分離を追求する場合その再現性上大きな問題となっている。本試験法では、この点を考慮し、当該色素のすべての不純物が同定されているわけではないため、最低限の条件として、同じような性質を持つ省令収載タール色素と完全に分離する分離条件を設定している。このため、設定に先立ち、省令収載タール色素のうち油溶性の色素すべてについて逆相系薄層クロマトグラフを用い、メタノールでの展開の可否を検討した。そしてその結果、展開可能な色素について本試験法に記述した条件でこれらが完全に分離することを確認した。これらの色素と1-フェニルアゾ-2-ナフトールの本条件下での分離例を図3に示す。したがって、分析に先立ち使用するカラムを、本試験法的高速液体クロマトグラフ条件のもとで1-フェニルアゾ-2-ナフトールとこれに一番近接するだいたい色401号とを用いて、その両者の分離をチェックし十分に分離することを確認してから用いることが望ましい。なお、分離の判定の目安として、対象色素の1-フェニルアゾ-2-ナフトール検量線作成用標準液とほぼ同じ濃度に調製した1-フェニルアゾ-2-ナフトールとだいたい色401号の混合液を 20 μ L 注入したとき、クロマトグラム上のそれぞれのピークの理論段数は 5000 以上、また、その分離度は絶対値で 1.1 以上あることが望ましい。なお、理論段数、分離度は図4、図5のように作図して求めるのが原則であるが、昨今のインテグレーターの普及を前提に考えるとき、以下の式により求めることも作図の個人差を避けるためには有効である。

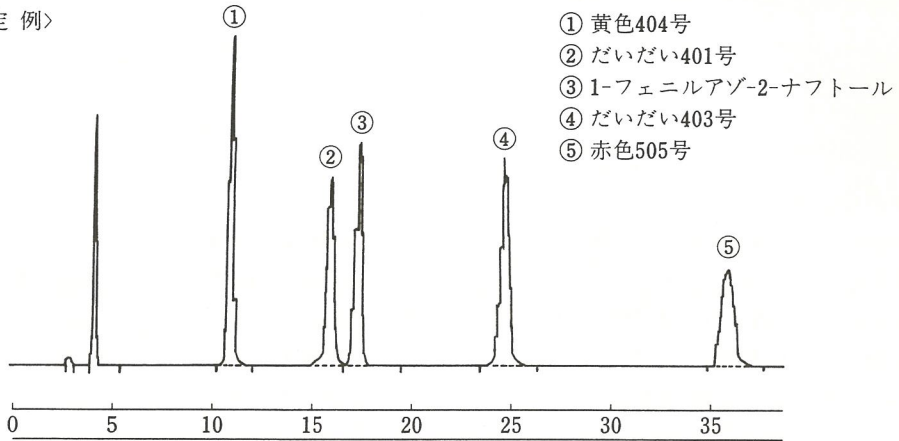
$$\text{理論段数 } N = (141.2 \times Tr \times Hi \div Ar)^2$$

Tr: リテンションタイム (min)

Hi: ピーク高さ (μ V)

Ar: ピーク面積 (μ V \cdot sec)

<測定例>



HPLC条件

装置：島津 LC-6A 溶離液：80% MeOH 1mL/min(197kg/cm²)
 Column：Nucleosil 5C18 検出：UV 230nm
 4.6×250mm 試料注入量：20μL/(SIL-6A使用)
 カラム温度：40℃ データ処理：島津 C-R3A

図3 油性色素と1-フェニルアゾ-2-ナフトールのクロマトグラム

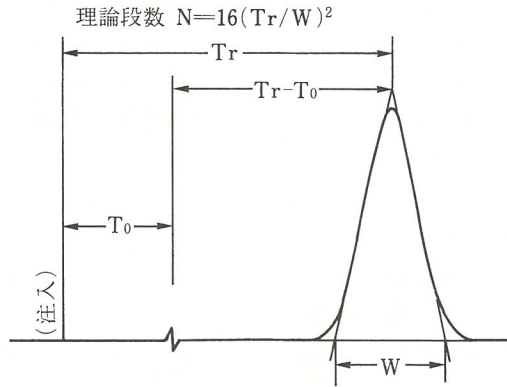


図4 理論段数

$$R_s = 2(T_{r1} - T_{r2}) / (1.70(W_{h1} + W_{h2}))$$

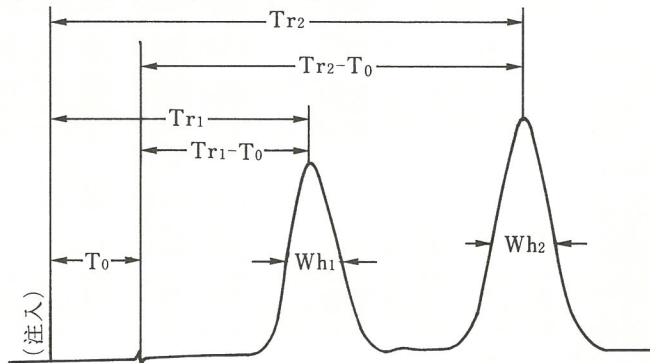


図5 分離度

$$\text{分離度 } R_s = 120(\text{Tr}_1 - \text{Tr}_2) / (1.70(\text{Ar}_1/\text{Hi}_1 + \text{Ar}_2/\text{Hi}_2))$$

Tr_1, Tr_2 : リテンションタイム (min)

Hi_1, Hi_2 : ピーク面積

Ar_1, Ar_2 : ピーク面積

(注1) 日本化粧品工業連合会では、技術資料 No. 85 (昭和63年11月29日) において、本試験法を紹介している。さらに、本書の初版においては、下記のとおり本試験法を18の色素に適用するとともに、それぞれの色素における参考限度値を示していた。

装置・器具

(注2) 例えば、TSK gel ODS-120T (4.6 mmID×250 mm)、TSK gel ODS-80TM (4.6 mmID×150 mm) : 東ソー(株)製、CAPCELL PAK C₁₈ (4.6 mmID×250 mm) : (株)資生堂製等がある。

(注3) 例えば、セップパック C₁₈ : ウォーターズ社製、またはボンドエルト C₁₈ : アナリティケム社製等がある。

操作法

(注4) 顔料を硫酸酸性溶液で解離させ色素本体を溶解させるとともに、カルシウム等の無機対イオンを硫酸塩として析出させる。

(注5) 不溶物の析出が完結するまで放置する。色素によりその時間は異なる。

(注6) 1-フェニルアゾ-2-ナフトールの保持時間が10~15分になるように、流速調整する。

本試験法を採用している色素と参考限度値を以下に示す。なお、参考限度値についてはFDA規格値、化粧品への配合量、使用頻度等を勘案した。

表2 1-フェニルアゾ-2-ナフトール試験法採用色素と参考限度値

色素名	参考限度値	試験法
黄色 5 号	10 ppm	第 1 法
赤色 502 号	10 ppm	第 1 法
赤色 503 号	10 ppm	第 1 法
だいたい色205号	10 ppm	第 2 法
だいたい色402号	10 ppm	第 2 法
赤色 201 号	5 ppm	第 3 法
赤色 202 号	5 ppm	第 3 法
赤色 203 号	5 ppm	第 3 法
赤色 204 号	5 ppm	第 3 法
赤色 205 号	5 ppm	第 3 法
赤色 219 号	5 ppm	第 3 法
赤色 221 号	5 ppm	第 3 法
赤色 228 号	5 ppm	第 3 法

赤色 405 号	5 ppm	第 3 法
赤色 225 号	0.3%	第 4 法
赤色 501 号	0.3%	第 4 法
赤色 505 号	0.3%	第 4 法
だいたい色403号	0.3%	第 5 法

■参考文献

- 1) 伊藤弘一, 江波戸舉秀, 原田裕文: 東京衛生年報, 30-1, 109, 1979.
- 2) 小塚民雄, 田代 実, 奥村雄司ら: 皮膚, 19, 191, 1977.
- 3) 小林美恵, 滋野 広, 福田金寿ら: 皮膚, 20, 245, 1978.
- 4) MARIE SABO, JOHN GROSS & IRA E. ROSENBERG: Journal of Society of Cosmetic Chemist., 35, 273, 1984.
- 5) 日本化粧品技術者会誌, 17(1), 27, 1983.

(※試薬・試液, 標準溶液に関しては, 改訂前の法定色素ハンドブックを参照)