

未指定添加物

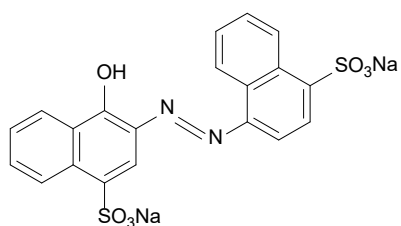
未指定酸性タール色素

Undesignated Acidic Tar Colors

アゾルビン

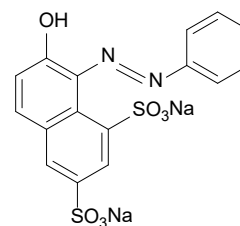
Azorubine

別名：カルモイシン (Carmoisine)


 $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2 : 502.43$
(C. I. 14720)

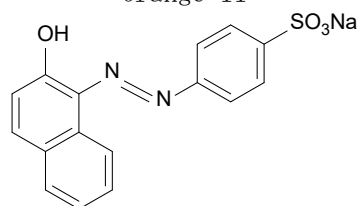
オレンジG

Orange G

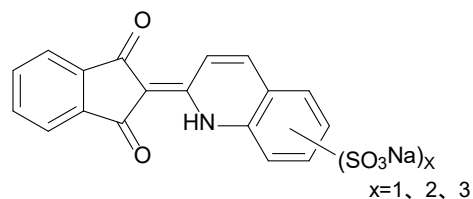

 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2 : 452.37$
(C. I. 16230)

オレンジII

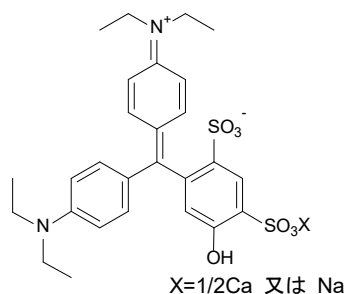
Orange II


 $C_{16}H_{11}N_2NaO_4S : 350.32$
(C. I. 15510)
キノリンイエロー¹⁾

Quinoline Yellow


 $C_{18}H_9NNa_2O_8S_2 : 477.38$
(ジスルホン化体を主成分色素として)
(C. I. 47005)
パテントブルーV²⁾

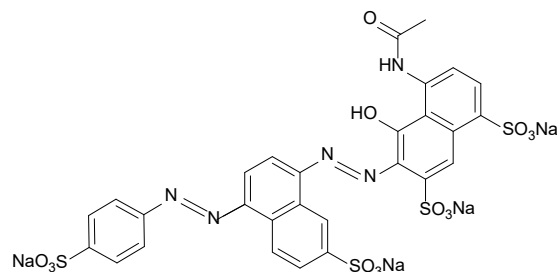
Patent Blue V

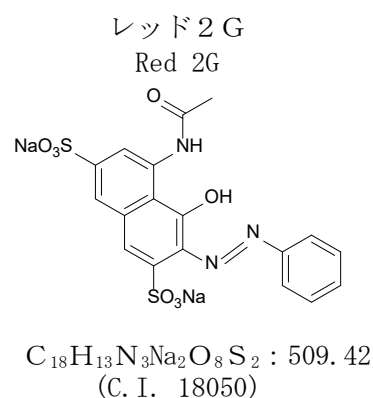
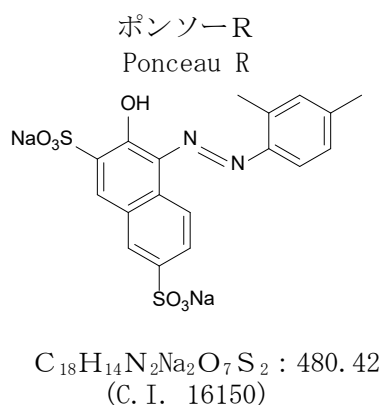

 Ca 塩： $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2 \cdot 1/2Ca : 579.71$
 Na 塩： $C_{27}H_{31}N_2O_7S_2Na : 582.66$
(C. I. 42051)

ブリリアントブラックBN

Brilliant Black BN

別名：ブラックPN (Black PN)


 $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4 : 867.68$
(C. I. 28440)



※上記は、未指定酸性タール色素の例示

1. 分析法の概要

食品中の未指定酸性タール色素（アズルビン、オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー、パテントブルーV、ブリリアントブラック BN及びレッド 2 G等）を薄層クロマトグラフィー³⁾により定性する。（2023 年改正）

2. 分析法（薄層クロマトグラフィー）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製

上記の（1）及び（2）については、食用タール色素分析法（1）及び（2）を準用する⁴⁾。

（3）標準溶液の調製⁵⁾

アズルビン、オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー、パテントブルーV、ブリリアントブラック BN、ポンソーR及びレッド 2 Gそれぞれ 20.0mg を量り、それぞれ水を加えて溶かし、20mL とし各色素標準原液とする。各色素標準原液 10mL を正確に量り、水を加えて 100mL とし、標準溶液とする（濃度 100µg/mL）。

（4）測定法

食用タール色素分析法の（4）測定法を準用する。

試薬・試液等

1. アズルビン：市販品を用いる。
2. オレンジG：市販品を用いる。

3. オレンジ II：市販品を用いる。
4. キノリンイエロー：市販品を用いる。
5. パテントブルー V：市販品を用いる。
6. ブリリアントブラック BN：市販品を用いる。
7. ポンソー R：市販品を用いる。
8. レッド 2 G：市販品を用いる。
9. 食用タール色素分析法の試薬・試液等を準用する。

[注]

- 1) キノリンイエローはスルホン酸基が 1～3 個結合したものの混合物であり、そのスルホン酸基の位置も異なることがあるため、薄層クロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーでは複数のスポットやピークが確認される。食品添加物として使用されるものにはスルホン酸基が 2～3 個結合したものの割合が多いが、試薬として購入できるキノリンイエローにはスルホン酸基が 1～2 個結合したものの含量が多い場合があるため、注意が必要である。
- 2) 海外で許可されているパテントブルー V は C. I. 42051 の色素であり、カルシウム塩のものと、ナトリウム塩のものがある。これらは薄層クロマトグラフィー及び液体クロマトグラフィーで同じ Rf 値及び同じ溶出時間を示す。一方、パテントブルー (C. I. 42045、別名パテントブルー VF、アズールブルー、ブルー VRS) は、パテントブルー V (C. I. 42051) の水酸基が一つ外れた構造をしており、薄層クロマトグラフィーの Rf 値や液体クロマトグラフィーの溶出時間がパテントブルー V (C. I. 42051) と異なる 文献 1、2) ので注意する。
- 3) 未指定酸性タール色素を特定する必要がある場合には、参考に示す分析法を用いることができる。
- 4) ブリリアントブラック BN が含まれている場合は、水浴上で加熱濃縮すると分解する可能性があるため、40℃以下で減圧濃縮して抽出液とするとよい。
- 5) 例示以外の未指定酸性タール色素の定性を行う場合は、定性対象化合物の試薬を標準溶液の調製に用いる。

[文献]

- 1) 荻原勉ら：東京衛研年報、**53**、153 (2002)
- 2) 新矢将尚ら：食衛誌、**61**、58 (2020)

参考

未指定酸性タール色素確認分析法

1. 分析法の概要

食品中の未指定酸性タール色素は、液体クロマトグラフィー又は液体クロマトグラフィー質量分析により確認を行う。(2023年設定)

2. 分析法(液体クロマトグラフィー又は液体クロマトグラフィー質量分析)

分析法A(液体クロマトグラフィー)

(1) 検体の採取と試料の調製

(2) 試験溶液の調製

上記の(1)及び(2)については、未指定酸性タール色素分析法(1)及び(2)を準用する。

(3) 標準溶液の調製

未指定酸性タール色素分析法(3)標準溶液の調製の各色素標準溶液10mLを量り、水を加えて100mLとしたものを標準溶液とする(濃度10 μ g/mL)。

(4) 測定法

① 測定条件¹⁾

フォトダイオードアレイ検出器付又は紫外可視吸光度検出器付液体クロマトグラフを用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤²⁾: オクタデシルシリル化シリカゲル(粒径5 μ m)

カラム管: 内径4.6mm、長さ150~250mm

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相³⁾: A液 0.01mol/L酢酸アンモニウム溶液

B液 アセトニトリル

グラジエントの条件⁴⁾

分	A (%)	B (%)
0	95	5
30	50	50
30.1	95	5
40	95	5

流速：1 mL/分

測定波長：450nm（オレンジG、オレンジ II、キノリンイエロー）

520nm（ポンソーR、アゾルビン、レッド2G）

580nm（ブリリアントブラックBN）

620nm（パテントブルーV）

注入量：10 μ L⁵⁾

② 定性⁶⁾

試験溶液及び標準溶液を液体クロマトグラフに注入し、試験溶液のクロマトグラム上に検出された各ピークの保持時間が標準溶液の各ピークと一致することを確認する。また、フォトダイオードアレイ検出器を用いる場合は、試験溶液と標準溶液の各ピークの吸収スペクトルを比較して定性を行う。

分析法B（液体クロマトグラフィー質量分析）

（1）検体の採取と試料の調製

（2）試験溶液の調製

上記の（1）及び（2）については、未指定酸性タール色素分析法（1）及び（2）を準用する。

（3）標準溶液の調製

未指定酸性タール色素分析法（3）標準溶液の調製の各色素標準溶液 10mL を量り、水を加えて 100mL としたものを標準溶液とする（濃度 10 μ g/mL）⁷⁾。

（4）測定法

① 測定条件⁸⁾

液体クロマトグラフ質量分析計（LC-MS）を用い、次の条件によって測定する。

カラム充填剤：オクタデシルシリル化シリカゲル（粒径 3～5 μ m）

カラム管：内径 2.1mm、長さ 150mm

カラム温度：40 $^{\circ}$ C付近の一定温度

移動相：A液 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液、B液 アセトニトリル

グラジエントの条件⁴⁾

分	A (%)	B (%)
0	95	5
30	50	50
30.1	95	5
40	95	5

流速：0.2mL/分

イオン化モード：ESI (+) 又は ESI (-)

検出法：スキャン (m/z 200~1000)

選択イオンモニタリング (SIM)

モニターイオン⁹⁾

化合物	イオン化モード	モニターイオン ^{*1} (m/z)
アズルビン	ESI (-)	457
オレンジG	ESI (+)	409
オレンジII	ESI (-)	327
キノリンイエロー (x=1)	ESI (+)	354
キノリンイエロー (x=2)	ESI (+)	434
キノリンイエロー (x=3)	ESI (+)	514
パテントブルーV	ESI (+)	561
ブリリアントブラックBN	ESI (-)	777
ポンソーR	ESI (+)	437
レッド2G	ESI (+)	467

*1：スキャン測定時の主なイオンも同じ。

注入量：5 μ L

② 定性¹⁰⁾

試験溶液及び標準溶液をLC-MSに注入し、試験溶液のクロマトグラム上で、各標準溶液で検出されたピークと同じ保持時間にピークが検出されること、これらピークのスキャン検出で得られるマススペクトルの主なイオンの m/z が各標準溶液の主ピークのそれと一致することを確認する。

試薬・試液等

1. 未指定酸性タール色素分析法の試薬・試液等を準用する。
2. 酢酸アンモニウム：[特級]
3. アセトニトリル：高速液体クロマトグラフィー用
4. 0.01mol/L酢酸アンモニウム溶液：酢酸アンモニウム 0.77gに水を加えて1Lとする。

[注]

- 1) 測定条件は例示である。グラジエントの条件は各色素と食品由来の夾雑物が分離するように、使用する分析カラムにより適宜変更する。
- 2) 市販のカラムとして内径4.6mm、長さ150mm、粒径5 μ mのカラムや、内径4.6mm、

長さ 250mm、粒径 5 μ m のカラム^{文献1)}が使用できる。

- 3) 移動相にイオンペア試薬を含む方法もある^{文献2、文献3)}。
- 4) ブリリアントブラック BN のピークが割れ、形状が悪くなることがある。試験溶液が 50vol% エタノール溶液であった場合、水で希釈し 25vol% エタノール溶液とするか、以下のグラジエント条件が使用できる。

グラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	99	1
1	99	1
3	90	10
30	50	50
30.1	99	1
40	99	1

- 5) 試料採取量や試験溶液濃度を変更した場合は、カラムへ負荷する試料相当量が (2) ~ (4) の操作の場合と同じになるように注入量を調整する。また、固形物が浮遊している場合はメンブランフィルター (0.45 μ m) でろ過する。
- 6) 液体クロマトグラフィーを用いた方法ではフォトダイオードアレイ検出器による吸収スペクトルによる同定方法^{文献1)}がある。
- 7) 液体クロマトグラフ質量分析計は装置によって感度が異なるため、試験溶液と標準溶液の濃度が高い場合は適宜水で希釈して用いる。
- 8) 測定条件は例示である。市販のカラムとして内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 μ m のカラムや、内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 3 μ m のカラム^{文献4)}が使用できる。

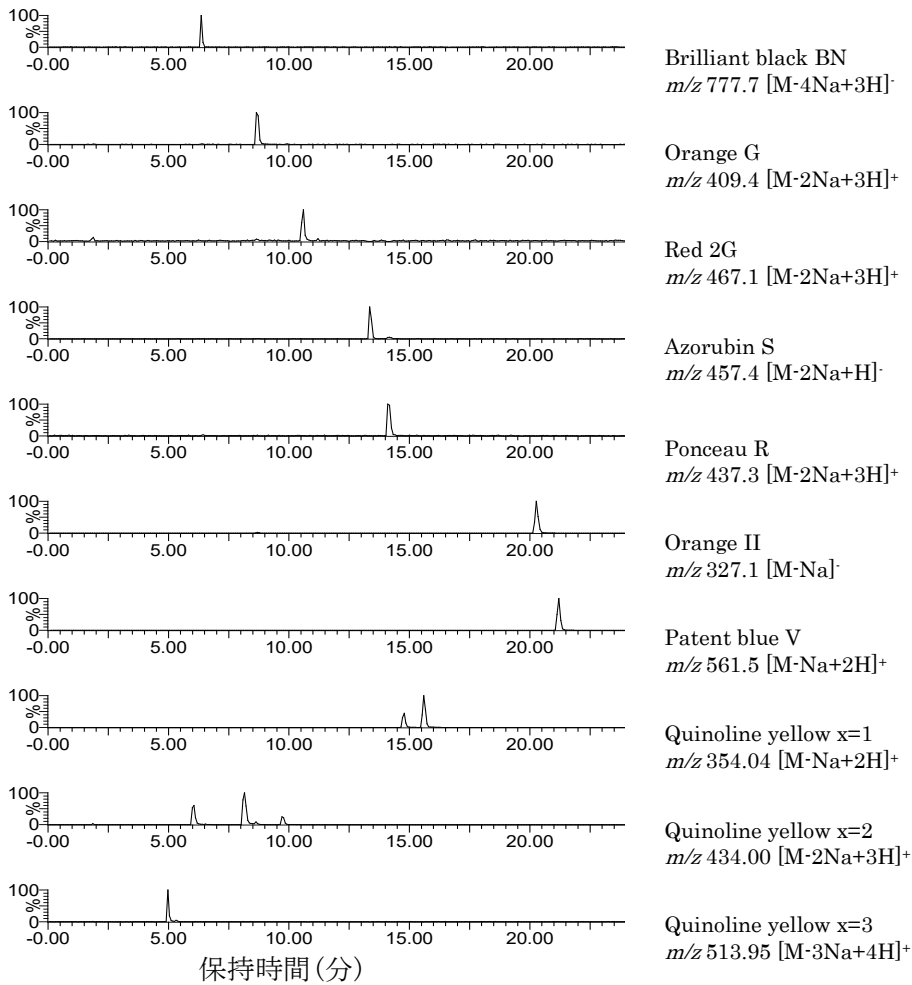
なお、グラジエントの条件は各色素と食品由来の夾雑物が分離するように、使用する分析カラムにより適宜変更する。また、イオン化の条件等は使用する質量分析計により異なる場合があるため、あらかじめ標準溶液を用いて最適な条件を確認するとよい。その他の測定条件は各測定機器に従い、標準溶液のピーク強度が最大となるようにあらかじめ最適化を行う。装置により、設定条件は異なる。

参考として、注図 1 に、本法によるクロマトグラム例を示す。また、フラグメントイオン確認のための MS 条件の例を以下に示す。

<MS 条件>

キャピラリー電圧: 3.00kV、 コーン電圧: 50.0V
エクストラクター: 3.00V、 ソース温度: 120°C
脱溶媒温度: 350°C、 コーンガス流量: 47L/時
脱溶媒ガス流量: 593L/時、 RF レンズ: 0.4V

モニターイオン



カラム：オクタデシルシリル化シリカゲルカラム（内径 2.1mm、長さ 150mm、粒径 5 μm）

カラム温度：40℃、流速：0.2mL/分、

移動相：A液 0.01mol/L 酢酸アンモニウム溶液、B液 アセトニトリル

グラジエントの条件

分	A (%)	B (%)
0	95	5
30	50	50
30.1	95	5
40	95	5

イオン化モード：ESI (+) 又は ESI (-)、検出法：SIM、注入量：5 μL

注図 1 未指定酸性タール色素の SIM クロマトグラム

9) LC-MSによる同様の分析例の報告もあり^{文献1、文献4~文献6)}、レッド2Gは m/z 464 [M-2Na+H]⁻、パテントブルーVは m/z 559 [M-Na]⁻、キノリンイエロー

($x = 1$) は m/z 352 $[M-Na]^-$ 、キノリンイエロー ($x = 2$) は m/z 432 $[M-2Na+H]^-$ がイオンとして検出されている。

- 10) LC-MS を用いて確認を行う場合、食品中の夾雑物の影響により確認を見誤るおそれがあるため、別途、対象試料の試験溶液に標準溶液を添加し、ピークの検出感度やマススペクトルの変化について確認するとよい。

[文献]

- 1) 石川ふさ子ら：食衛誌、**46**、228 (2005)
- 2) 石川ふさ子ら：食衛誌、**41**、194 (2000)
- 3) 宮武ノリエら：東京健安研セ年報、**56**、145 (2005)
- 4) 関戸晴子ら：神奈川衛研報、**38**、35 (2008)
- 5) 荻原勉ら：東京衛研年報、**53**、153 (2002)
- 6) 山口瑞香ら：食衛誌、**56**、8 (2015)