

食品中著色劑之檢驗方法 - 多重分析方法

摻偽及不法藥物科

報告人：吳冠彥、郭景豪

107.10.15



著色劑檢驗方法

公告檢驗方法 2013/09/06

食品中著色劑之檢驗方法(MOHWA0016.01)

建議檢驗方法	發佈日期
食品中著色劑之檢驗方法(二)(TFDAA0057.01)	2018/6/27
食品中著色劑之檢驗方法—多重分析方法(TFDAA0065.01)	2018/6/27
米製品中玫瑰紅B、酸性玫瑰紅B、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑之鑑別方法(TFDAA0059.01)	2018/6/27
食品中蘇丹色素之檢驗方法(TFDAA0062.01)	2017/12/8
食品中二甲基黃及二乙基黃之鑑別方法(TFDAA0028.00)	2014/12/24
食用油中Cu-pyropheophytin A之檢驗方法(TFDAA0018.00)	2014/1/23
食用油中銅葉綠素之鑑別方法(TFDAA0016.01)	2013/12/25
食品中銅葉綠素鈉之鑑別方法(TFDAA0017.01)	2013/12/25
辣椒粉中鹼性橙及羅丹明B檢驗方法(TFDAA0007.00)	2012/10/30
食品中規定外煤焦色素之檢驗方法(TFDAA0006.00)	2012/8/23



著色劑檢驗公告方法

101 年 11 月 19 日署授食字第 1011903531 號公告
102 年 9 月 6 日部授食字第 1021950329 號公告修正

食品中著色劑之檢驗方法

Method of Test for Colors in Foods

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於食品中著色劑之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取及毛線染色後，以濾紙層析 (paper chromatograph, PC)、薄層層析 (thin layer chromatograph, TLC) 及高效液相層析儀 (high performance liquid chromatograph, HPLC) 分析之方法。
 - 2.1. 檢體之調製：
 - 2.1.1. 試藥：乙醇、醋酸、乙醚、石油醚、氨水(25%)及氯化鈉均採用試藥級；去離子水(比電阻於 25℃ 可達 18 MΩ · cm 以



著色劑檢驗公告方法 - 檢測項目

著色劑(英文)	台灣	大陸 (別名)	國際 (C.I. No.)	美國 (FD&C No.)	歐盟 (E No.)
Brilliant Blue FCF	食用藍色1號	亮藍	42090	Blue No.1	E133
Erythrosine (Eosine)	食用紅色7號	赤薔紅 (櫻桃紅)	45430	Red No.3	E127
Indigo Carmine (Indigotine)	食用藍色2號	靛藍	73015	Blue No.2	E132
Cochineal red A (Ponceau 4R , New Coccin)	食用紅色6號	胭脂紅 (麗春紅)	16255	禁用	E124
Sunset Yellow FCF	食用黃色5號	日落黃	15985	Yellow No.6	E110
Tartrazine	食用黃色4號	檸檬黃 (酒石黃)	19140	Yellow No.5	E102
Fast Green FCF	食用綠色3號	堅牢綠	42053	Green No.3	E143
Allura Red AC	食用紅色40號	誘惑紅	16035	Red No.40	E 129



檢液之調製

依檢體型態及特性使用下列方法

1.液態檢體

水溶性：試樣20~200 mL，加1~3倍量的蒸餾水

酒精性檢體：沸水浴加熱蒸發後，再加水至原容量或稀釋

2.固形食品

試樣20~200克，磨碎再依檢體類別調製。

a.糖果；b.醃漬類蔬菜；c.果凍、果醬、味噌、餡等食品；
d.巧克力、可可、奶油等製品；e.穀類製品；f.口香糖類。

3.水產及畜產食品

試樣20~200克，磨碎再依固形食品之d.步驟調製檢液。



檢液之調製

a.糖果：

加5倍量熱水溶解。

b.醃漬類蔬菜：

4-5倍量80%乙醇，放置2-3小時，完全分離液體後，加1%氨水之70%乙醇反覆浸出，得到萃取液，以6%醋酸中和，經煮沸使氨蒸發後，做為檢液，若檢體仍著色時，再用1%醋酸之70%乙醇，以10%氨水中和，經煮沸使氨蒸發後，加水至原容量作為檢體。

c.果凍、果醬、味噌、餡等食品：

檢體加入約3-5倍量之熱水，混合後以玻璃棉過濾，取濾液作為試驗溶液，若仍有色素未抽出來，依b法調製。



檢液之調製

d.巧克力、可可、奶油等製品：

以乙醚先脫脂，檢體上乙醚自然揮發後，再依b法調製。

e.穀類製品：

檢體加入約5倍量之80%乙醇，放置24小時浸出液於水浴上蒸發濃縮至原容量1/5再加1/4容量之25%NaCl及1%氨水使呈鹼性移入分液漏斗，用同量的石油醚脫脂，下層液以6%醋酸中和後作為試驗溶液，上層液若有顏色應以6%醋酸萃取，取出醋酸中和後，併入前項試驗液。

f.口香糖類：

加5倍量熱水，冷卻過濾後做為試驗溶液，若仍有色依b法。



毛線染色分離

毛線處理：

脫脂：索式萃取器以乙醚將毛線脫脂之後，風乾並以水清洗後再風乾。

脫螢光物：以強氨水浸泡置45°C水浴30-60分鐘取出毛線，再置入稀氨水(1 氨水：99水)中充分攪拌再用溫水、冷水沖洗。後再風乾。

檢液之調製原理：

1. 酸性，加熱下脫脂毛線染色。
2. 鹼性，加熱下脫脂毛線脫色。
3. 著色劑對纖維具有附著能力。附著之著色劑不易被清水沖洗。藉以去除檢體基質干擾。



著色劑檢驗公告方法

檢液之調製：

依著色濃度取試驗溶液 5~20 mL，置於燒杯中，加 1N 醋酸溶液 1 mL 使呈酸性後，投入毛線 0.1 g，攪拌後置於水浴上加熱 30 分鐘。取出已著色之毛線，以水充分沖洗後，將毛線移入另一燒杯中，加 1% 氨水溶液 5 mL，於水浴上加熱 30 分鐘，使色素溶出後，去除毛線，加入 10% 醋酸溶液 2 mL，使呈酸性，再投入新毛線 0.1 g 攪拌，置於水浴上加熱 30 分鐘，毛線著色時，即有酸性色素存在。取出著色毛線，依前述操作加入 1% 氨水溶液，使色素溶出，並濃縮至約 0.5 mL，供作檢液。



公開建議檢驗方法

2017-07-28 本署公開建議檢驗方法

食品中著色劑之檢驗方法 - 多重分析方法 (二)
(草案審查中即將公開)

以液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS)分析飲料及糖果中食用紅色四十號(Allura red AC)等49項著色劑之鑑別方法。



裝置：

1.1. 液相層析串聯質譜儀：

1.1.1. 離子源：電灑離子化(Electrospray ionization, ESI)。

1.1.2. 層析管：HSS T3，1.8 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。

1.2. 離心機(Centrifuge)：可達15000 $\times g$ 以上。

1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。

1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)：溫控可達38°C以上。

1.5. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。



試藥

甲醇、乙腈及乙酸乙酯均採用液相層析級；
甲酸銨採用試藥特級；去離子水(比電阻於
25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；食用紅色四十
號等49項對照用標準品。



標準溶液之配製：

- 取著色劑對照用標準品各約5 mg，精確稱定，分別以適當溶劑(如附表)溶解並定容至50 mL，作為標準原液，冷藏避光貯存。
- 臨用時取適量各標準原液混合，參考附表之偵測極限，以50%甲醇溶液稀釋至對應之濃度，供作標準溶液。



檢液之調製

飲料類檢體：

1. 含二氧化碳之檢體應先以超音波振盪去除二氧化碳。
2. 取混勻後檢體約5 g，精確稱定，以50%甲醇溶液定容至25 mL。
3. 取1 mL移至微量離心管中，於 $15000 \times g$ 離心5分鐘，取上清液，供作檢液。



檢液之調製

糖果類檢體：

1. 將檢體均質後，取約1 g，精確稱定，置於15 mL離心管中。
2. 加入50%甲醇溶液2 mL(註)，旋渦混合30秒，於38 °C水浴中超音波振盪15分鐘。
3. 經5000 ×g離心5分鐘，收集上清液至減壓濃縮瓶中。
4. 殘渣再加入乙腈2 mL，旋渦混合30秒，於38 °C水浴中超音波振盪15分鐘。
5. 經5000 ×g離心5分鐘，收集上清液至減壓濃縮瓶中。
6. 合併上清液，於55 °C減壓濃縮至剛乾後，加入50%甲醇溶液5 mL，旋渦混合30秒，於15000 ×g離心5分鐘，取上清液，供作檢液。

註 檢體無法完全浸泡於溶劑時，可增加溶劑添加量。



鑑別試驗

- 精確量取檢液及標準溶液各2 μ L，分別注入液相層析串聯質譜儀中。
- 依液相層析串聯質譜儀條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間、滯留時間及多重反應偵測相對離子強度鑑別之。



LC條件

1. 層析管：HSS T3，1.8 μm ，內徑2.1 mm × 10 cm。
2. 層析管溫度：35°C
3. 移動相流速：0.3 mL/min
4. 注入量：2 μL
5. 移動相梯度流洗：
A：5 mM 甲酸銨溶液
(稱取甲酸銨0.315 g，以去離子水溶解使成1000 mL，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。)
B：乙腈



移動相梯度

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 2.0	95 → 95	5 → 5
2.0 → 5.0	95 → 40	5 → 60
5.0 → 8.0	40 → 20	60 → 80
8.0 → 10.5	20 → 5	80 → 95
10.5 → 14.0	5 → 5	95 → 95
14.0 → 14.1	5 → 0	95 → 100
14.1 → 18.0	0 → 0	100 → 100
18.0 → 18.5	0 → 95	100 → 5
18.5 → 25.0	95 → 95	5 → 5



質譜條件

- 毛細管電壓(Capillary voltage) :
- 電灑離子化正離子(ESI⁺)採用2.5 kV ,
- 電灑離子化負離子(ESI⁻)採用1.6 kV 。
- 離子源溫度(Ion source temperature) : 150°C 。
- 溶媒揮散溫度(Desolvation temperature) : 450°C 。
- 進樣錐氣體流速(Cone gas flow) : 150 L/hr 。
- 溶媒揮散流速(Desolvation flow) : 950 L/hr 。
- 偵測模式：多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM) 。



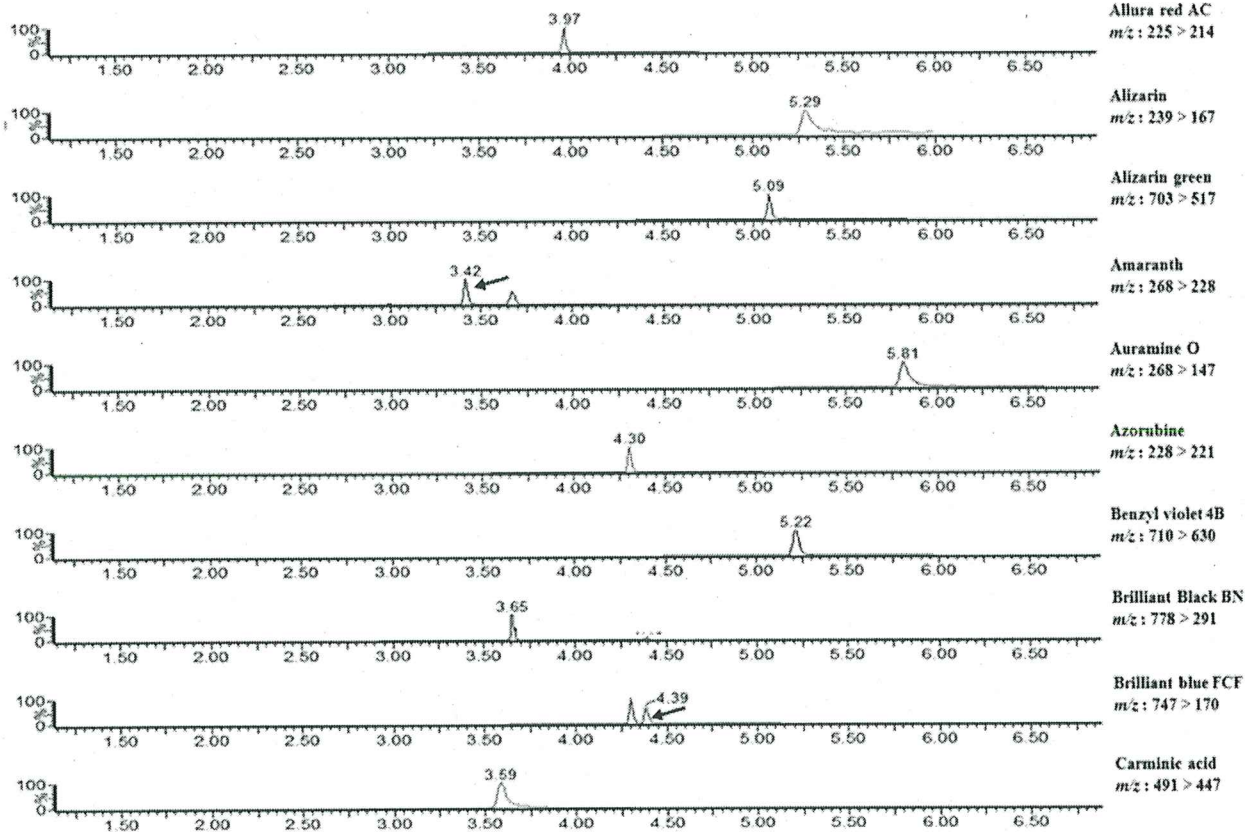
鑑別試驗

註1：相對離子強度由2對離子對之波峰面積比而得(≤100%)，容許範圍如下：

相對離子強度(%)	容許範圍(%)
> 50	± 20
> 20~50	± 25
> 10~20	± 30
≤ 10	± 50

註2：上述測定條件分析不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。



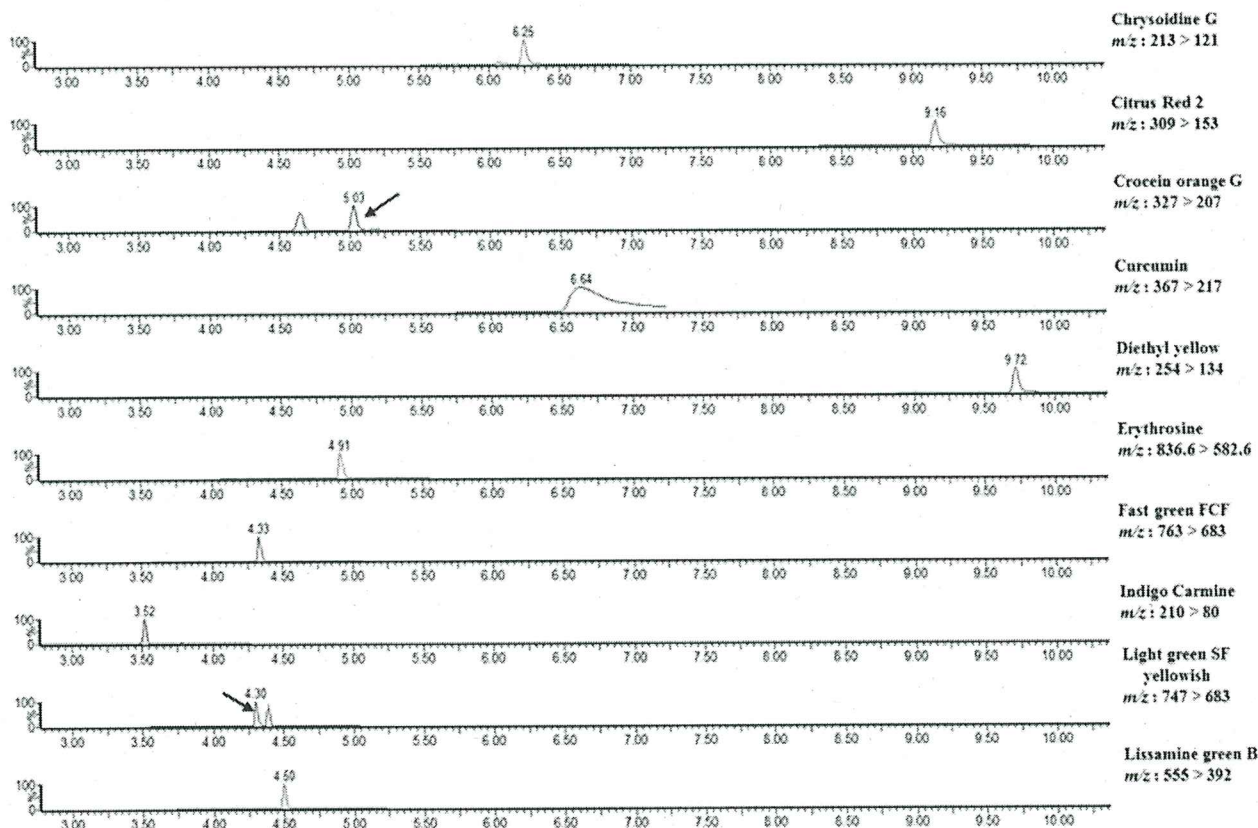


參考層析圖譜



21

21

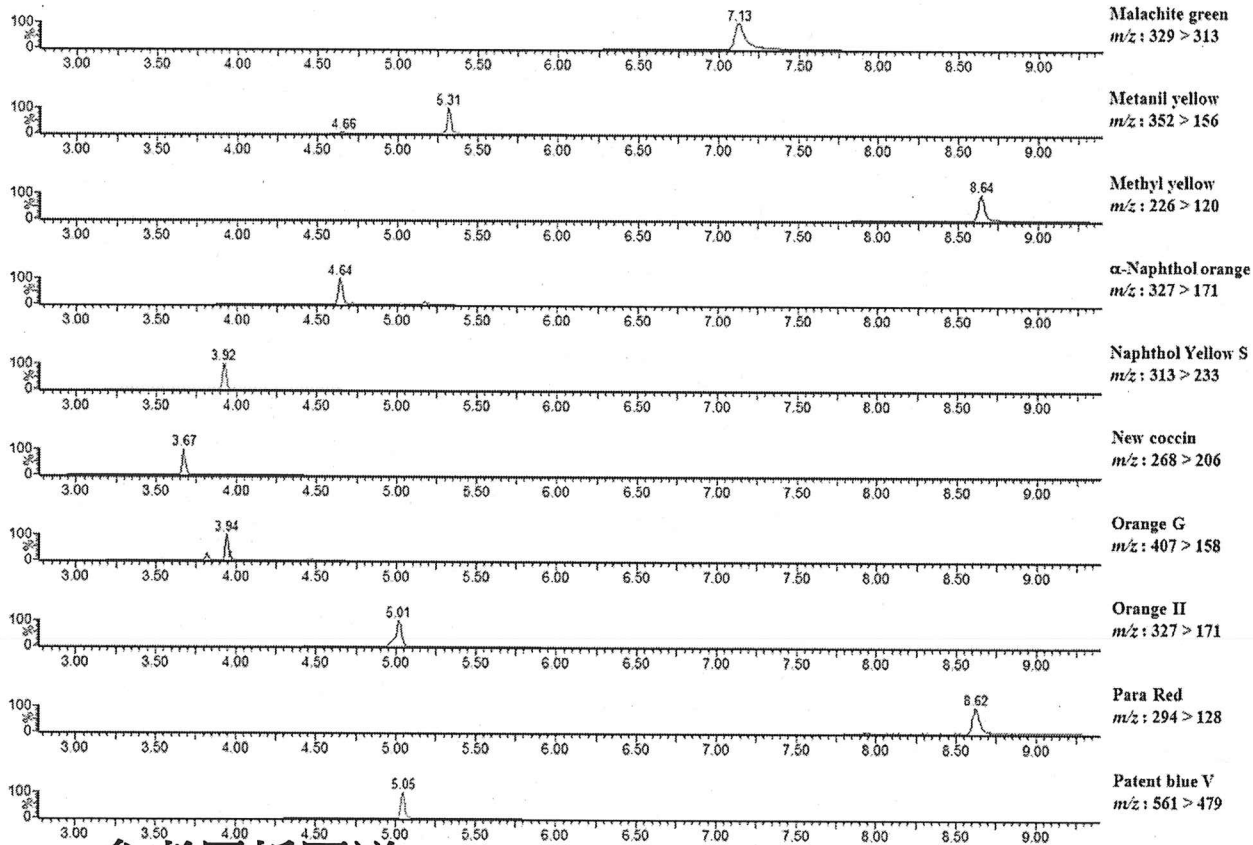


參考層析圖譜



22

22



參考層析圖譜

23

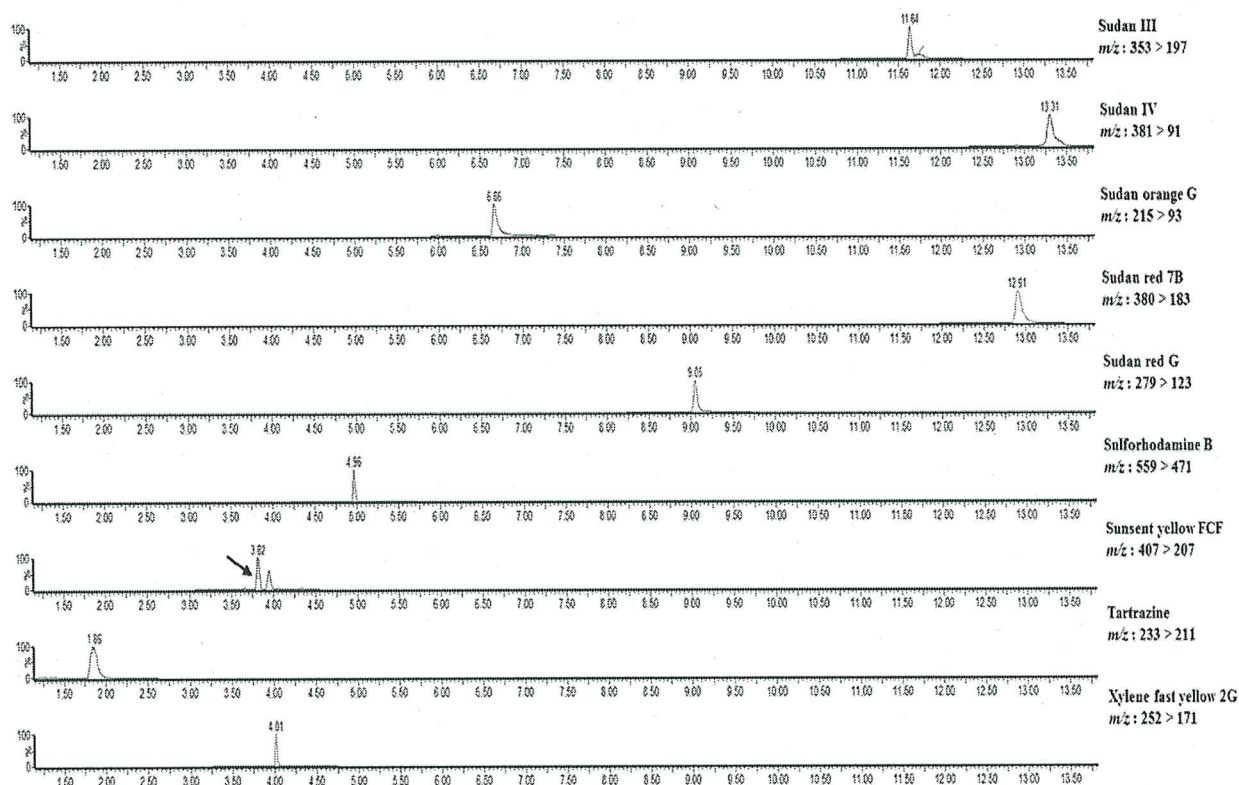
23



參考層析圖譜

24

24



方法之偵測極限 (LOD)

分析物	LOD (ppm)
Alizarin、Brilliant black BN	10
Auramine O、Chrysoidine G、 Diethyl yellow、Malachite green、 Methyl yellow、Rhodamine B	0.1
其餘41項著色劑	1

項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對	進樣鉅電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	偵測 極限 (ppm)
	英文名	中文名				前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
1	Allura red AC	食用紅色四十號	25956-17-6	50%甲醇溶液	ESI-	225 > 214	-45	-15	1
						225 > 200	-45	-15	
2	Alizarin	茜素	72-48-0	甲醇	ESI-	239 > 211	-15	-25	10
						239 > 195	-15	-24	
3	Alizarin green	茜素綠	4857-81-2	50%甲醇溶液	ESI+	703 > 517	5	51	1
						703 > 533	5	43	
4	Amaranth	莧菜紅	915-67-3	50%甲醇溶液	ESI-	268 > 228	-15	-22	1
						268 > 206	-15	-14	
5	Auramine O	金胺O	2465-27-2	50%甲醇溶液	ESI+	268 > 147	-25	-27	0.1
						268 > 131	-25	-44	
6	Azorubine	偶氮玉紅	3567-69-9	50%甲醇溶液	ESI-	228 > 221	-15	-12	1
						228 > 170	-15	-16	
7	Benzyl violet 4B	紫色1號	1694-09-3	50%甲醇溶液	ESI-	710 > 630	-36	-34	1
						710 > 540	-36	-39	
8	Brilliant black BN	黑色素	2519-30-4	50%甲醇溶液	ESI-	778 > 291	-10	-45	10
						778 > 732	-10	-35	
9	Brilliant blue FCF	食用藍色一號	3844-45-9	50%甲醇溶液	ESI-	747 > 170	-55	-56	1
						747 > 260	-55	-50	
10	Carminic acid	胭脂蟲酸	1260-17-9	50%甲醇溶液	ESI-	491 > 447	-10	-18	1
						491 > 357	-10	-26	



項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對	進樣鉅電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	偵測 極限 (ppm)
	英文名	中文名				前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
11	Chrysoidine G	鹼性橙	532-82-1	50%甲醇溶液	ESI+	213 > 121	30	20	0.1
						213 > 94	30	23	
12	Citrus red 2	柑橘紅2號	6358-53-8	乙腈	ESI+	309 > 153	24	20	1
						309 > 278	24	18	
13	Crocein orange G	藏花橙G	1934-20-9	50%甲醇溶液	ESI-	327 > 207	-30	-30	1
						327 > 142	-30	-30	
14	Curcumin	薑黃素	458-37-7	50%甲醇溶液	ESI-	367 > 217	-17	-10	1
						367 > 149	-17	-20	
15	Diethyl yellow	二乙基黃	2481-94-9	乙腈	ESI+	254 > 134	18	25	0.1
						254 > 147	18	25	
16	Erythrosine	食用紅色七號	16423-68-0	50%甲醇溶液	ESI+	836.6 > 582.6	15	50	1
						836.6 > 709.6	15	40	
17	Fast green FCF	食用綠色三號	2353-45-9	50%甲醇溶液	ESI-	763 > 683	-52	-36	1
						763 > 497	-52	-52	
18	Indigo carmine	食用藍色二號	860-22-0	50%甲醇溶液	ESI-	210 > 80	-45	-20	1
						210 > 156	-45	-20	
19	Light green SF yellowish	亮綠SF淡黃	5141-20-8	50%甲醇溶液	ESI-	747 > 683	-55	-36	1
						747 > 170	-55	-56	
20	Lissamine green B	-	3087-16-9	50%甲醇溶液	ESI+	555 > 392	40	35	1
						555 > 473	40	25	



項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對	進樣錐電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	偵測 極限 (ppm)
	英文名	中文名				前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
41	Sudan III	蘇丹三號	85-86-9	乙腈	ESI+	353 > 197	50	25	1
						353 > 156	50	19	
42	Sudan IV	蘇丹四號	85-83-6	乙腈	ESI+	381 > 91	50	22	1
						381 > 224	50	20	
43	Sudan orange G	蘇丹橙G	2051-85-6	乙腈	ESI+	215 > 93	24	18	1
						215 > 122	24	14	
44	Sudan red 7B	蘇丹紅7B	6368-72-5	乙腈	ESI+	380 > 183	25	13	1
						380 > 169	25	25	
45	Sudan red G	蘇丹紅G	1229-55-6	乙腈	ESI+	279 > 123	20	18	1
						279 > 108	20	34	
46	Sulforhodamine B	酸性玫瑰紅B	3520-42-1	50%甲醇溶液	ESI+	559 > 471	22	62	1
						559 > 514	22	50	
47	Sunsent yellow FCF	食用黃色五號	2783-94-0	50%甲醇溶液	ESI-	407 > 207	-35	-30	1
						407 > 171	-35	-35	
48	Tartrazine	食用黃色四號	1934-21-0	50%甲醇溶液	ESI-	233 > 211	-30	-30	1
						233 > 198	-30	-10	
49	Xylene fast yellow 2G	-	6359-98-4	50%甲醇溶液	ESI-	252 > 171	-45	-22	1
						252 > 107	-45	-16	



結論

- 本研究建立以液相層析串聯質譜儀 (liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC/MS/MS) 分析飲料及糖果中食用紅色四十號(Allura red AC)等49項著色劑之鑑別方法。
- 本方法以簡單快速之萃取流程搭配液相層析串聯質譜儀，有效提高檢驗效率。
- 本方法經過本署檢驗方法審議小組同意後，將儘速公開供外界參考。
- 建議檢驗方法係供國內外各界參考及依循，實驗室可依需求進行方法修正，經確效試驗並確認可達偵測極限後使用。



項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對	進樣錐電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	偵測 極限 (ppm)
	英文名	中文名				前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
21	Malachite green	孔雀綠	2437-29-8	50%甲醇溶液	ESI+	329 > 313	30	36	0.1
						329 > 208	30	37	
22	Metanil yellow	皂黃	587-98-4	50%甲醇溶液	ESI-	352 > 156	-27	-30	1
						352 > 80	-27	-45	
23	Methyl yellow	甲基黃	60-11-7	乙腈	ESI+	226 > 120	18	30	0.1
						226 > 77	18	20	
24	α -Naphthol orange	α -萘酚橙	523-44-4	50%甲醇溶液	ESI-	327 > 171	-30	-20	1
						327 > 247	-30	-20	
25	Naphthol yellow S	萘酚黃S	846-70-8	50%甲醇溶液	ESI-	313 > 233	-25	-22	1
						313 > 296	-25	-22	
26	New coccin	食用紅色六號	2611-82-7	50%甲醇溶液	ESI-	268 > 206	-15	-11	1
						268 > 302	-15	-11	
27	Orange G	橙黃G	1936-15-8	50%甲醇溶液	ESI-	407 > 158	-35	-30	1
						407 > 327	-35	-20	
28	Orange II	-	633-96-5	50%甲醇溶液	ESI-	327 > 171	-30	-20	1
						327 > 156	-30	-35	
29	Para red	對位紅	6410-10-2	乙腈	ESI+	294 > 128	28	24	1
						294 > 156	28	19	
30	Patent blue V	-	20262-76-4	50%甲醇溶液	ESI+	561 > 479	20	35	1
						561 > 435	20	50	



項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對	進樣錐電 壓 (V)	碰撞 能量 (eV)	偵測 極限 (ppm)
	英文名	中文名				前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
31	Phloxine	夾竹桃紅	18472-87-2	乙腈	ESI-	784 > 658	-50	-30	1
						784 > 704	-50	-26	
32	Ponceau SX	麗春紅SX	4548-53-2	50%甲醇溶液	ESI-	435 > 355	-50	-22	1
						435 > 199	-50	-36	
33	Quinoline yellow WS	喹啉黃	8004-92-0	50%甲醇溶液	ESI-	352 > 288	-55	-30	1
						352 > 272	-55	-35	
34	Rhodamine B	玫瑰紅B	81-88-9	50%甲醇溶液	ESI+	443 > 355	50	56	0.1
						443 > 399	50	51	
35	Rose bengal	孟加拉玫瑰紅	632-69-9	50%甲醇溶液	ESI-	970.5 > 672.6	-55	-32	1
						970.5 > 890.5	-55	-26	
36	Scarlet GN	-	3257-28-1	50%甲醇溶液	ESI+	437 > 201	15	25	1
						437 > 118	15	40	
37	Solvent green 3	-	128-80-3	乙酸乙酯	ESI+	419 > 327	10	25	1
						419 > 401	10	25	
38	Sudan black B	蘇丹墨B	4197-25-5	乙酸乙酯	ESI+	457 > 194	4	38	1
						457 > 211	4	26	
39	Sudan I	蘇丹一號	842-07-9	乙腈	ESI+	249 > 156	30	14	1
						249 > 128	30	28	
40	Sudan II	蘇丹二號	3118-97-6	乙腈	ESI+	277 > 121	30	24	1
						277 > 260	30	11	





檢驗方法諮詢信箱：
TFDAmethod@fda.gov.tw

