

食品中著色劑之檢驗方法－多重分析方法(二)

Method of Test for Colorants in Foods - Multiple Analysis (2)

1. 適用範圍：本檢驗方法適用於飲料及糖果中食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑(品項如附表)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經萃取後，以液相層析串聯質譜儀(liquid chromatograph/tandem mass spectrometer, LC-MS/MS)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 液相層析串聯質譜儀：
 - 2.1.1.1. 離子源：電灑離子化(electrospray ionization, ESI)。
 - 2.1.1.2. 層析管：HSS T3，1.8 μm ，內徑2.1 mm $\times$ 10 cm，或同級品。
 - 2.1.2. 離心機(Centrifuge)：可達15000 $\times g$ 以上。
 - 2.1.3. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.1.4. 超音波振盪器(Ultrasonicator)：溫控可達38 $^{\circ}\text{C}$ 以上。
 - 2.1.5. 減壓濃縮裝置(Rotary evaporator)。
 - 2.2. 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 $^{\circ}\text{C}$ 可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；食用紅色四十號等51項對照用標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：10 mL及500 mL。
 - 2.3.2. 離心管：15 mL，PP材質。
 - 2.3.3. 濾膜：孔徑0.45 μm ，Nylon 材質。
 - 2.4. 50%甲醇溶液之調製：

取甲醇250 mL，加去離子水使成500 mL。
 - 2.5. 移動相溶液之調製：
 - 2.5.1. 移動相溶液A：

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。
 - 2.5.2. 移動相溶液B：乙腈。
 - 2.6. 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(如偵測極限為1 ppm，其對應之濃度為0.2 $\mu\text{g/mL}$)，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

2.7.1 飲料：

含二氧化碳之檢體應先以超音波振盪去除二氧化碳，取混勻後檢體約5 g，精確稱定，以50%甲醇溶液定容至25 mL，於15000 ×g離心5分鐘，取上清液，供作檢液。

2.7.2 糖果：

將檢體均質後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，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，再經5000 ×g離心5分鐘，收集上清液，殘渣再加入乙腈2 mL，旋渦混合30秒，重複上述步驟萃取1次，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。

2.8. 鑑別試驗：

精確量取檢液及標準溶液各2 µL，分別注入液相層析串聯質譜儀中，依下列條件進行分析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及多重反應偵測相對離子強度^(註1)鑑別之。

液相層析串聯質譜分析測定條件^(註2)：

層析管：HSS T3，1.8 µm，內徑2.1 mm × 10 cm。

層析管溫度：35°C。

注入量：2 µL。

移動相溶液：A液與B液以下列條件進行梯度分析

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

移動相流速：0.3 mL/min。

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)。

偵測離子對、進樣錐電壓(cone voltage)與碰撞能量
(collision energy)如表一及表二。

註1：相對離子強度由2對離子對之波峰面積比而得($\leq 100\%$)，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。

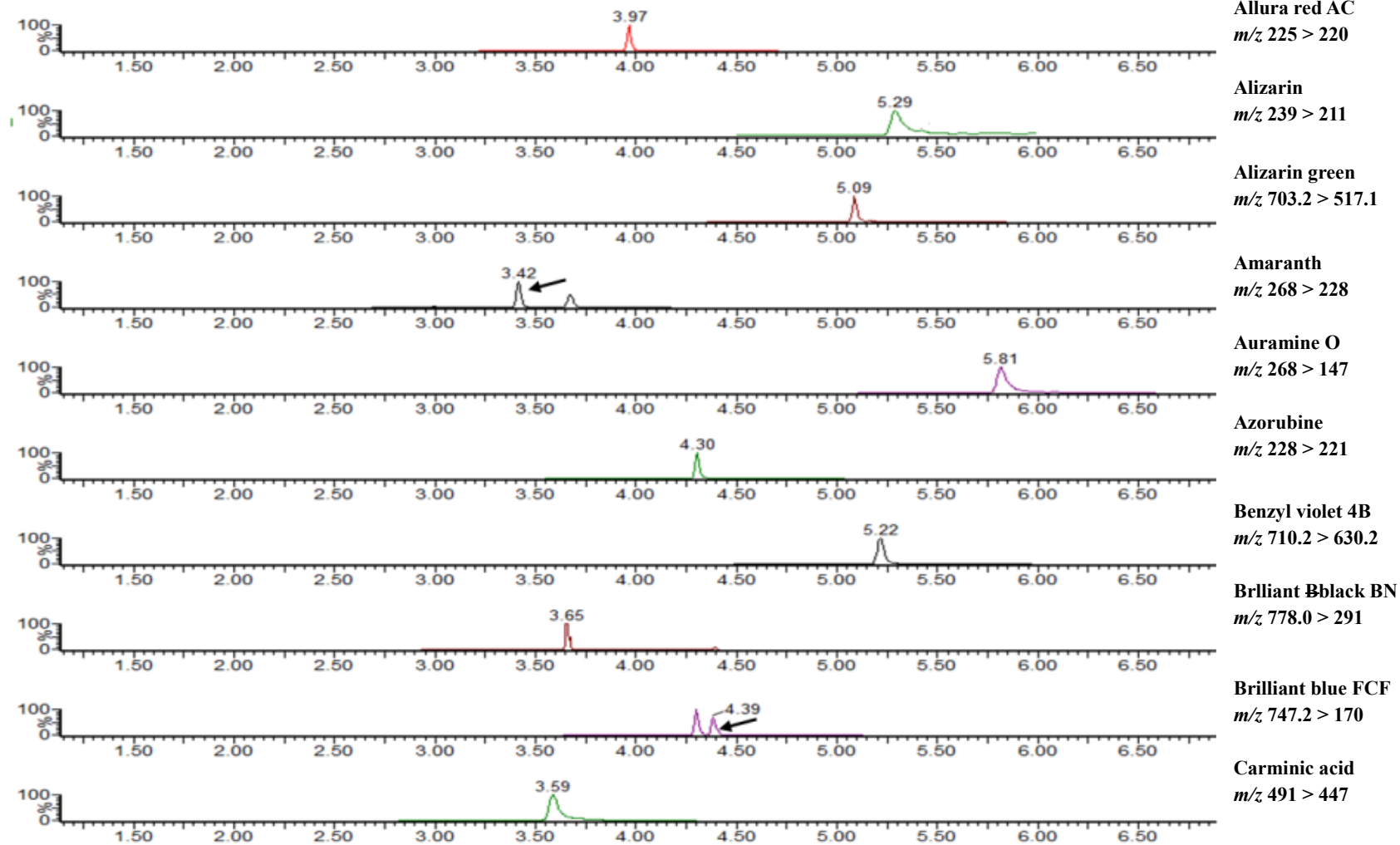
附註：1. 本檢驗方法之偵測極限如附表。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

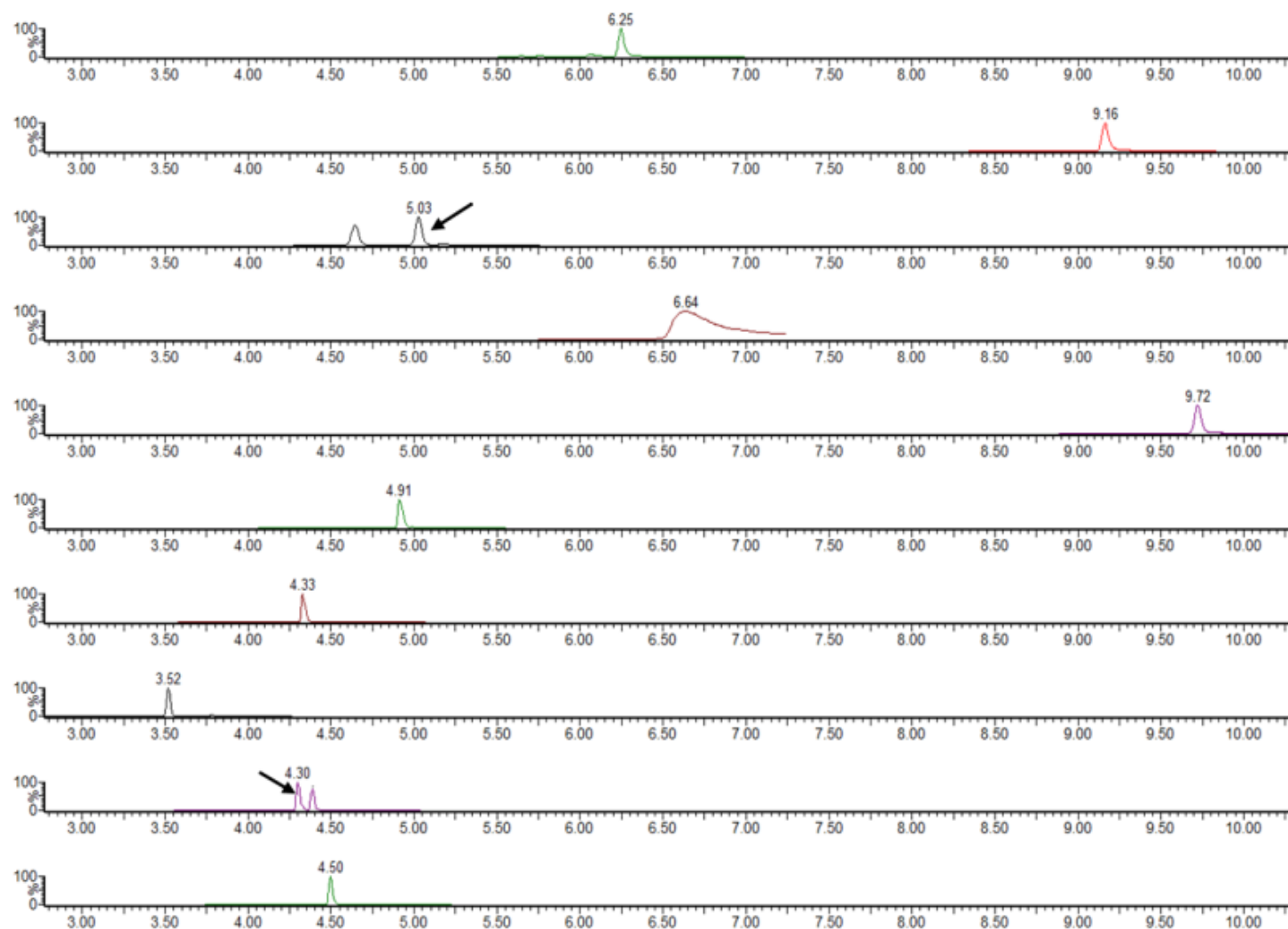
參考文獻：

1. Jia, W., Chu, X., Ling, Y., Huang, J., Lin, Y. and Chang, J. 2014. Simultaneous of dyes in wines by HPLC coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry. J. Sep. Sci. 37: 782-791.
2. Tsai, C. F., Kuo, C. H, and Shih, D. Y. C. 2015. Determination of 20 synthetic dyes in chili powders and syrup-preserved fruits by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. J. Food Drug Anal. 23: 453-462.
3. Al Tamim, A., AlRabeh, M., Al Tamimi, A., AlAjlan, A. and Alowaiifeer, A. 2020. Fast and simple method for the detection and quantification of 15 synthetic dyes in sauce, cotton candy, and pickle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Arab. J. Chem. 13: 3882-3888.

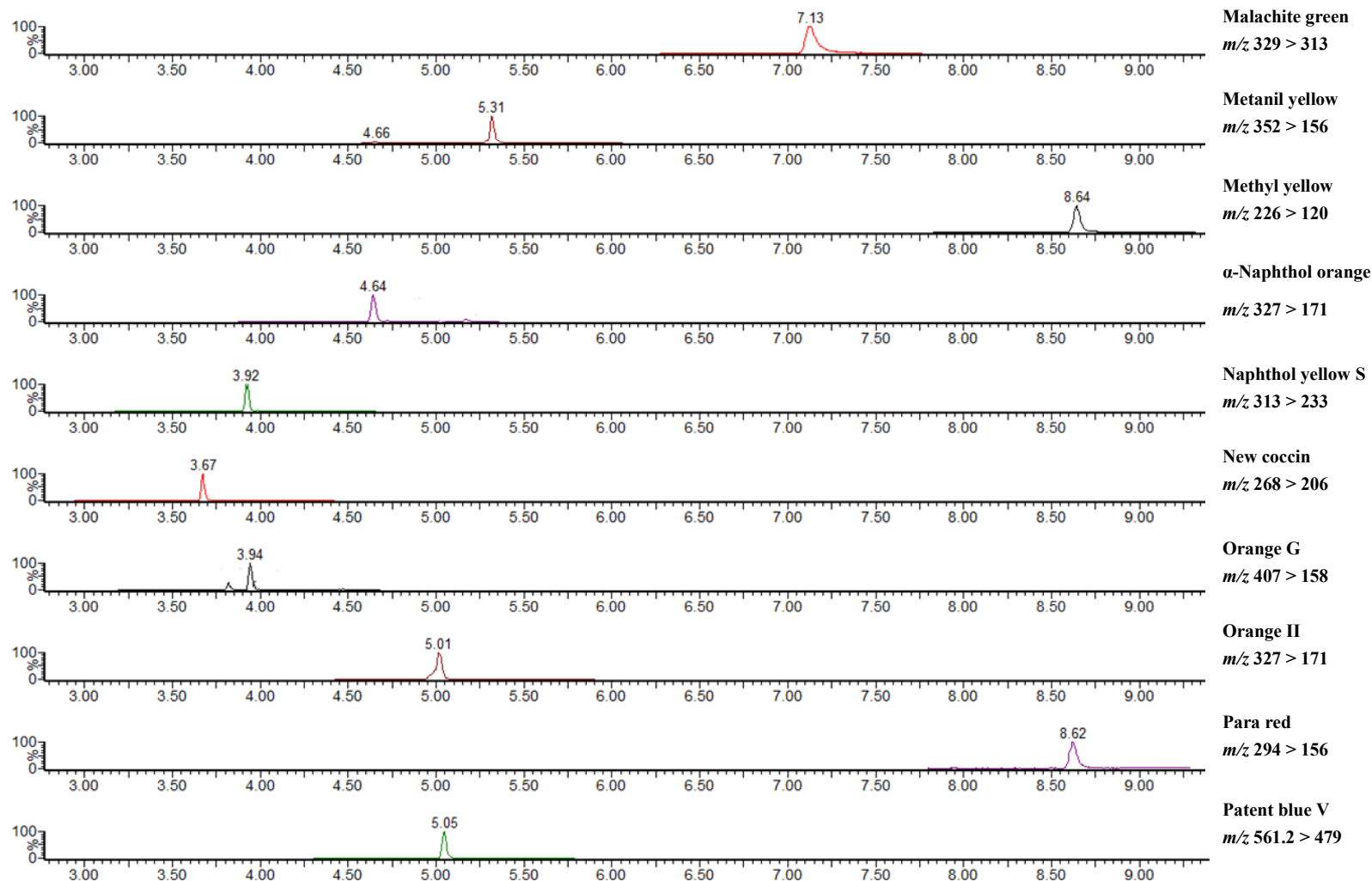
參考層析圖譜



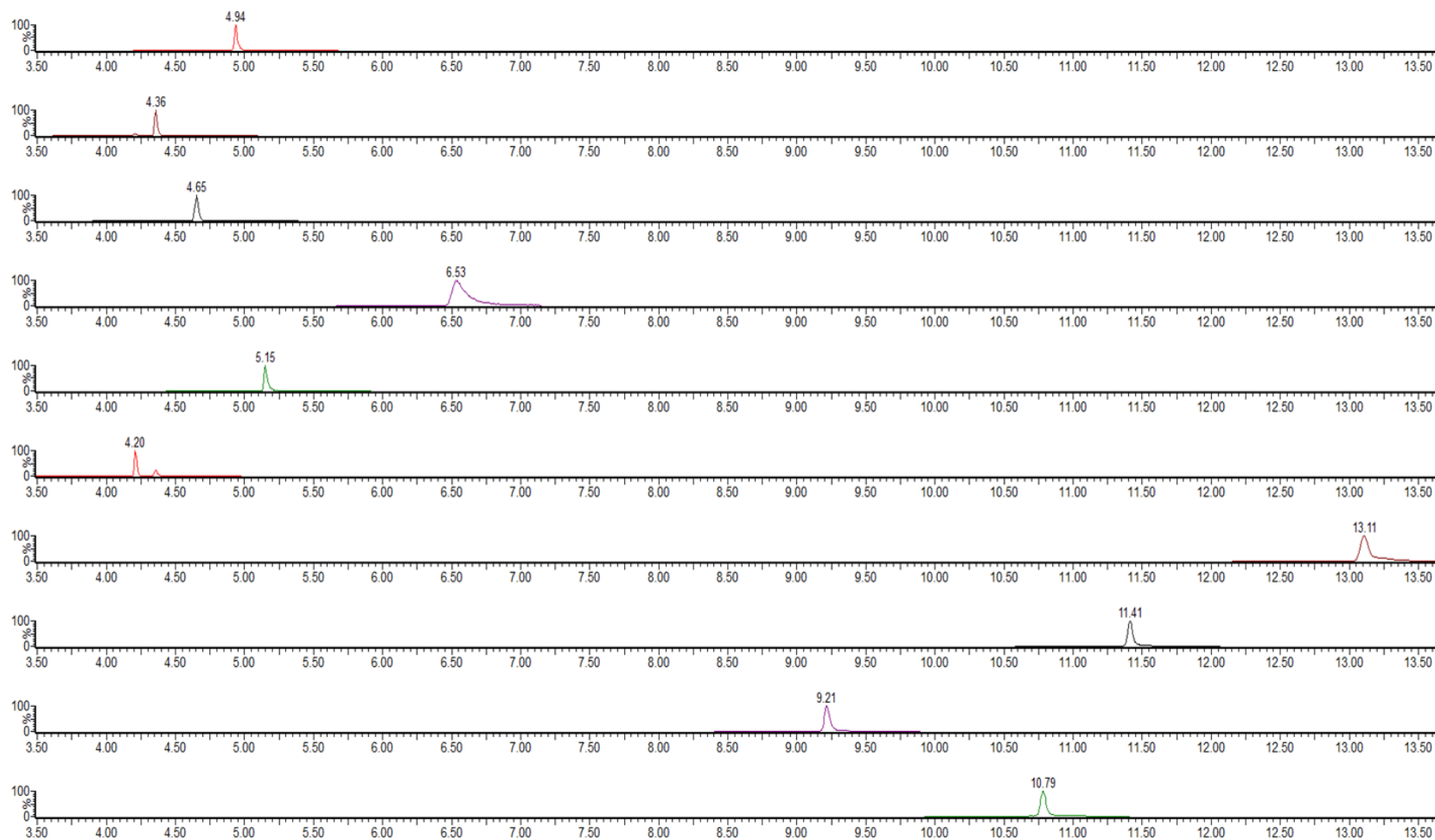
圖、以 LC-MS/MS 分析食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑之 MRM 圖譜



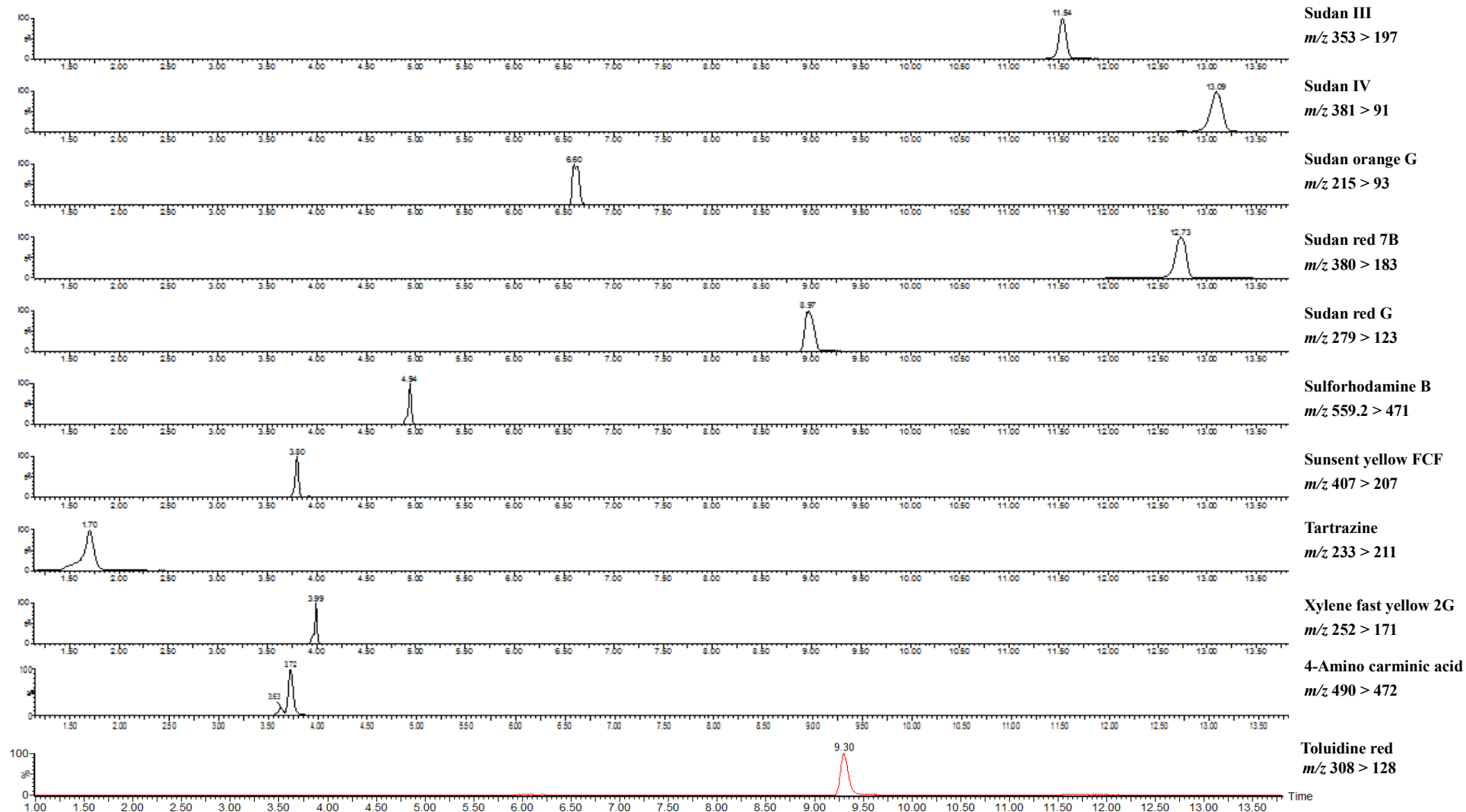
圖、以 LC-MS/MS 分析食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑之 MRM 圖譜(續)



圖、以 LC-MS/MS 分析食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑之 MRM 圖譜(續)



圖、以 LC-MS/MS 分析食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑之 MRM 圖譜(續)



圖、以 LC-MS/MS 分析食用紅色四十號(Allura red AC)等 51 項著色劑之 MRM 圖譜(續)

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限

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)			
1	Allura red AC	食用紅色四十號	25956-17-6	50%甲醇溶液	ESI-	225 > 200	-45	-15	1
						225 > 214	-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+	703.2 > 517.1	5	51	1
						703.2 > 533.2	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-	710.2 > 630.2	-36	-34	1
						710.2 > 540.2	-36	-39	
8	Brilliant black BN	黑色素	2519-30-4	50%甲醇溶液	ESI-	778.0 > 291	-10	-45	10
						778.0 > 732.0	-10	-35	
9	Brilliant blue FCF	食用藍色一號	3844-45-9	50%甲醇溶液	ESI-	747.2 > 170	-55	-56	1
						747.2 > 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	

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限(續)

項次	分析物		CAS #	標準原液	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		配製溶劑		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 > 681.5	15	45	
17	Fast green FCF	食用綠色三號	2353-45-9	50% 甲醇溶液	ESI-	763.1 > 683.2	-52	-36	1
						763.1 > 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-	747.2 > 683.2	-55	-36	1
						747.2 > 170	-55	-56	
20	Lissamine green B	—	3087-16-9	50% 甲醇溶液	ESI+	555.1 > 392	40	35	1
						555.1 > 473	40	25	

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限(續)

項次	分析物		CAS #	標準原液	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		配製溶劑		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 > 156	28	19	1
						294 > 128	28	24	
30	Patent blue V	—	20262-76-4	50% 甲醇溶液	ESI+	561.2 > 479	20	35	1
						561.2 > 435	20	50	

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限(續)

項次	分析物		CAS #	標準原液 配製溶劑	離子化 模式	離子對 前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)	進樣錐電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	偵測極限 (ppm)
	英文名	中文名							
31	Phloxine	夾竹桃紅	18472-87-2	乙腈	ESI-	784.5 > 658.6	-50	-30	1
						784.5 > 704.6	-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	

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限(續)

項次	分析物		CAS #	標準原液	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		配製溶劑		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+	559.2 > 471	22	62	1
						559.2 > 514.2	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	
50	4-Amino carminic acid	4-氨基-胭脂紅酸	—	50%甲醇溶液	ESI-	490 > 472	-11	-31	1
						490 > 356	-11	-27	

附表、食用紅色四十號等 51 項著色劑之多重反應偵測模式參數及偵測極限(續)

項次	分析物		CAS #	標準原液	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		配製溶劑		前驅離子(m/z)> 產物離子(m/z)			
51	Toluidine red	甲苯胺紅	2425-85-6	乙腈	ESI+	308 > 128	8	27	1
						308 > 152	8	25	