

# 食品中規定外煤焦色素分離 鑑別方法之探討

程俊龍 黃春子 蘇淑珠 李樹其

## 第 四 組

## 摘 要

食品中規定外煤焦色素係指具有強毒性或致癌性,因安全顧慮公告刪除者(如Amaranth)及與我國規定不符之輸入國法定煤焦色素(如AcidRed)。本研究針對八種規定內煤焦色素及Amaranth等十六種規定外煤焦色素,依據中國國家標準食品中著色劑之檢驗方法,將檢體中之色素抽出後,分別以濾紙層析法,薄層層析法及高效液相層析法等三種方法進行分析探討,結果均能獲得良好之分離效果。其分離條件分別為濾紙層析用濾紙為東洋濾紙No.50,理想展開溶媒為氨水:水(5:95)之溶液100ml中含檸檬酸鈉2g等四種。薄層層析部份,薄層板為矽膠,展開溶媒為丙酮:丁酮:氨水:水(60:140:1:60)等六種展開溶媒。至於高效液相層析之分析條件則為層析管:LichroCART RP-18,移動相:(a)酸性煤焦色素為0.005 M Tetrabutyl Ammonium Phosphate與甲醇兩種溶媒採線性梯度遞變,(b)鹽基性煤焦色素為0.005M Pentane Sulphonic Acid與甲醇(15:85),紫外部檢出器:254nm。本計畫抽購70件檢體,包括國產食品52件,進口食品18件,經檢驗結果,使用規定外煤焦色素之檢體,國產食品8件,進口食品1件,共計9件,佔12.86%。檢出情形分別為Rhodamine B一件,OrangeⅡ二件,Phloxine一件,Metanil Yellow一件,另外四件則檢出MetanilYellow及OrangeⅡ兩種混合使用之規定外煤焦色素。其餘61件檢體均使用規定內煤焦色素,佔87.14%。三種分離鑑別方法中,薄層層析法之凝聚性及感度皆較濾紙層析法為佳,高效液相層析法除了確認鑑別外,又可利用其高感度檢驗色素濃度較低之檢體,同時尚可定量。

鍵語:規定外煤焦色素 (Illegal Coal Tar Dyes), 濾紙層析法 (Paper Chromatography, PC), 薄層層析法 (Thin Layer Chromatography, TLC), 高效液相層析法 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)

## 前 言

食品美觀之色澤不但能引發人們之食慾,且能提升食物之商品價值,而原先使用於食品

中之著色劑為天然之有機色素,唯這些色素,易受光和熱之影響而變色,且供應量不足等問題,因此研究開發人工合成色素來代替。合成色素即為煤焦色素,係由煤焦分離物芳香族碳化氫與無機或有機藥品之化學合成品,因需經磺化,重氮化,耦化等化學反應,其過程中有害物質之污染機會又多,以致其安全性不斷在研討評估,作為修正許可之食用色素品目之依據。現在我國法定食用色素只有八種,均屬水溶性酸性色素。除已被證實毒性強或具有致癌性及有安全性顧慮公告刪除之品目外,由於不同國家有不同法規,而近年貿易自由化,以致於很多食品輸入某一國家時,其所含色素卻為該國所禁用者,鑑此,本計畫擬以濾紙層析法,薄層層析法及高效液相層析法三種方法分別探討鑑別我國規定外煤焦色素,以資配合含有該合成色素之飲品管理,維護國民健康。

本局曾於73年至78年間進行兒童食品,民俗食品及進口食品中煤焦色素使用現況之調查<sup>1,2,3</sup>,結果發現國內使用之規定外煤焦色素有Rhodamine B, Amaranth等,進口食品中輸出國准用而本國不准添加之色素有Amaranth, Phloxine及Acid Red等。本計畫就上述檢出之規定外煤焦色素,同時參照世界各國著色劑之許可狀況<sup>4</sup>,選定食用紅色六號等八種規定內煤焦色素及十六種規定外煤焦色素進行分離鑑別。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

自78年2月至78年5月間抽購國產食品52件,其中包括糖果糕餅類17件,魚肉豆乾類12件,蜜餞乾果類12件,乾麵類2件,飲料類3件及其他6件。進口食品18件,包括糖果餅乾類16件及飲料類2件,共計70件。

### 二、檢驗方法

#### (一)裝置,器具及材料

##### 1. 高效液相層析儀

- (1) 溶媒輸送系統: Waters 600E
- (2) 紫外線檢出器: Waters Model 481
- (3) 積分儀: Shimadzu C-R3A

##### 2. 紫外燈: 365nm

##### 3. 水浴

4. 展開槽: 230mm × 80mm × 220mm

##### 5. 脫脂毛線

##### 6. 毛細管

7. 濾紙: 東洋濾紙No.50

8. 薄層板: 矽膠60F254 MERCK, 氧化鋁, 纖維素及聚醯胺

9. 過濾膜: 0.45um

#### (二) 試藥

1. 醋酸, 氨水, 正丁醇, 乙醇, 異丁醇, 檸檬酸鈉, 丁酮, 丙酮, 異丙醇, 醋酸乙酯, 甲醇, 正戊醇, 異戊醇均採試藥級。

2. HPLC移動相之甲醇採LC級。

3. 0.005M Tetrabutyl Ammonium Phosphate(TBAP pH7.5)

4. 0.005M Pentane Sulphonic Acid(PSA pH3.5)

#### (三) 標準品

- |                               |    |       |
|-------------------------------|----|-------|
| 1. 食用紅色六號(New Coccin)         | CI | 16255 |
| 2. 食用紅色七號(Erythrosine)        | CI | 45430 |
| 3. 食用紅色四十號(Allura Red AC)     |    |       |
|                               | CI | 16035 |
| 4. 食用黃色四號(Tartrazine)         | CI | 19140 |
| 5. 食用黃色五號(Sunset Yellow FCF)  |    |       |
|                               | CI | 15985 |
| 6. 食用綠色三號(Fast Green FCF)     |    |       |
|                               | CI | 42053 |
| 7. 食用藍色一號(Brilliant Blue FCF) |    |       |
|                               | CI | 42090 |
| 8. 食用藍色二號(Indigo Carmine)     |    |       |
|                               | CI | 73015 |
| 9. Amaranth                   | CI | 16185 |
| 10. Rose Bengale              |    |       |
|                               | CI | 45440 |
| 11. Phloxine                  | CI | 45410 |
| 12. Acid Red                  | CI | 45100 |
| 13. Azo Rubine(Carmoisine)    | CI | 14720 |
| 14. Ponceau SX                | CI | 14700 |
| 15. Quinoline Yellow          | CI | 47005 |
| 16. Orange II                 | CI | 15510 |
| 17. Rhodamine B               | CI | 45170 |
- 以上十七種標準品購自東京化成工業株式會

社

|                              |          |
|------------------------------|----------|
| 18.Scarlet GN                | CI 14815 |
| 19.Black BN(Brilliant Black) | CI 28440 |
| 20.Auramine                  | CI 41000 |
| 21.Malachite Green           | CI 42000 |
| 以上四種標準品購自CHROMA              |          |
| 22.Metanil Yellow            | CI 13065 |
| 23.Patent Blue Violet        | CI 42051 |
| 以上兩種標準品購自SIGMA               |          |
| 24.Naphthol Yellow S         | CI 10316 |
| 本標準品購自和光純藥工業株式會社             |          |

#### (四)標準溶液之調製

每種標準品分別以水調製成100ppm及1ppm之標準溶液。

#### (五)檢液之調製

依據中國國家標準10889N 6185-色素之檢驗<sup>5</sup>,將檢體中之色素加水溶解,於醋酸酸性下以脫脂毛線染色,再將染色毛線加10%氨水加熱脫色,使色素浸出,濃縮後供作檢液。

#### (六)HPLC移動相溶液之調製

TBAP及PSA分別調製成0.005M之水溶液後,以孔徑0.45 $\mu$ m之濾膜過濾。

#### (七)分離鑑別方法

##### 1.濾紙層析條件

展開溶媒有下列六種:

正丁醇:乙醇:N / 2氨水(6:2:3)

正丁醇:乙醇:N / 2醋酸(6:2:3)

異丁醇:乙醇:水(3:2:2)之溶液99ml中加氨水1ml

氨水:水(5:95)之溶液100ml中含檸檬酸鈉2g

丁酮:丙酮:水(7:3:3)

80%乙醇

##### 2.薄層層析條件

展開溶媒有下列六種:

異丙醇:氨水(4:1)

正丁醇:醋酸:水(10:5:6)

醋酸乙酯:甲醇:氨水(3:1:1)

正戊醇:乙醇:氨水(10:10:1)

甲醇:乙醇:異戊醇:氨水(15:10:5:3)

丙酮:丁酮:氨水:水(60:140:1:60)

##### 3.高效液相層析條件

分離管: $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>,10 $\mu$ m(4mm

$\times 25\text{cm}$ )<sup>10</sup>

LichroCART RP-18,5 $\mu$ m

(4mm $\times$ 12.5cm)

紫外線檢出器:UV 254nm

流速:1ml/min

移動相:

##### ①酸性煤焦色素:

爲了分離二十一種酸性煤焦色素,擬利用0.005MTetrabutyl Ammonium Phosphate及甲醇兩種溶媒採線性梯度遞變(linear gradient)予以分析。

##### ②鹽基性煤焦色素:

利用0.005M Pentane Sulphonic Acid及甲醇以固定比率(isocratic)來分離三種鹽基性色素。

## 結果與討論

### 一、濾紙層析法

濾紙層析法係1944年Consden等人所創之分析法<sup>4</sup>,以層析用濾紙爲固定擔體之固定相,展開溶媒爲移動相,利用物質對固定相及移動相分配係數之差異使物質分離的方法,而用於色素之確認及其純度試驗,其展開方法有上昇法及下降法,其層析用濾紙一般可分爲1號,2號,3號,及4號等,展開時之溫度一般在15~25 $^{\circ}\text{C}$ 最適當,展開距離通常在15~30cm之間。本計劃所使用之東洋濾紙(株)製品之層析用濾紙No.50相當於層析用濾紙2號,溫度約爲25 $^{\circ}\text{C}$ ,展開距離在15~17cm之間。經以前列該24種煤焦色素標準品首先以CNS公告方法<sup>5</sup>中最常使用之二種正丁醇系列之展開溶媒予以試驗,然後再以多種不同極性之展開溶媒予以展開分離鑑別。結果(a),(b),(c),(d)四種展開溶媒爲試驗多種展開溶媒中對於分離鑑別該二十四種煤焦色素效果較好者,其中(a),(b),二種爲CNS公告方法中最常使用者(見表一)。

由表一上之 $R_f$ 值資料,可比較出各色系對各展開溶媒之展開效果。當使用展開溶媒(a)正丁醇:乙醇:N / 2氨水(6:2:3)展開時,其 $R_f$ 值在0.07~0.94之間,可適用各色系煤焦色素之分離鑑別,只有紅色系煤焦色素中New Coccin及Azo Rubine之 $R_f$ 值較接近,難光憑 $R_f$ 值鑑別,但

均可觀察其斑點之原呈色澤及在365nmUV燈照射下之不同反應(見表二)以輔助確認鑑別。而使用展開溶媒(b)正丁醇:乙醇:N / 2醋酸(6:2:3)之展開結果,其 $R_f$ 值在0.02~0.97之間,為黃色系色素分離效果最佳之展開溶媒,藍色系及紅色系煤焦色素次之。使用展開溶媒(c)異丁醇:乙醇:水(3:2:2)之溶液99ml中加氨水1ml<sup>6</sup>展開時,其 $R_f$ 值在0.06~0.99之間,紅色系煤焦色素

之分離效果較差,但Rose Bengale及Phloxine二種色素對此展開溶媒分離出之斑點凝聚性最佳,而七種黃色系色素部份,其分離效果不錯,至於六種藍色系色素部份,只有Brilliant Blue FCF及Patent Blue Violet之 $R_f$ 值幾乎相同,不易鑑別外,其餘四種均有良好之分離效果。使用展開溶媒(d)氨水:水(5:95)之溶液100ml中含檸檬酸鈉2g<sup>6</sup>展開時,其 $R_f$ 值在0.03~0.95之間,

表一 濾紙層析法四種展開溶媒之 $R_f$ 值

| 色系  | No | 色素名稱               | $R_f$ 值 |      |      |              |
|-----|----|--------------------|---------|------|------|--------------|
|     |    |                    | (a)     | (b)  | (c)  | (d)          |
| 紅色系 | 1  | New Coccin         | 0.22    | 0.14 | 0.35 | 0.50         |
|     | 2  | Erythrosine        | 0.56    | 0.91 | 0.70 | 0.03         |
|     | 3  | Allura Red AC      | 0.48    | 0.32 | 0.61 | 0.17         |
|     | 4  | Amaranth           | 0.13    | 0.04 | 0.22 | 0.31         |
|     | 5  | Scarlet GN         | 0.51    | 0.43 | 0.67 | 0.83         |
|     | 6  | Rose Bengale       | 0.67    | 0.76 | 0.76 | 0.11         |
|     | 7  | Phloxine           | 0.65    | 0.82 | 0.75 | 0.20         |
|     | 8  | Acid Red           | 0.60    | 0.51 | 0.74 | 0.57         |
|     | 9  | Azo Rubine         | 0.23    | 0.38 | 0.23 | 0.11         |
|     | 10 | Ponceau SX         | 0.40    | 0.35 | 0.46 | 0.31         |
| 黃色系 | 11 | Tartrazine         | 0.09    | 0.04 | 0.23 | 0.61         |
|     | 12 | Sunset Yellow FCF  | 0.41    | 0.25 | 0.58 | 0.33         |
|     | 13 | Quinoline Yellow   | 0.50    | 0.49 | 0.69 | 0.05, 0.15 * |
|     | 14 | Naphthol Yellow S  | 0.44    | 0.40 | 0.64 | 0.33         |
|     | 15 | Orange II          | 0.66    | 0.58 | 0.82 | 0.13         |
|     | 16 | Metanil Yellow     | 0.77    | 0.68 | 0.89 | 0.08         |
| 藍色系 | 17 | Fast Green FCF     | 0.37    | 0.39 | 0.49 | 0.95         |
|     | 18 | Brilliant Blue FCF | 0.44    | 0.38 | 0.65 | 0.91         |
|     | 19 | Indigo Carmine     | 0.15    | 0.06 | 0.26 | 0.13         |
|     | 20 | Patent Blue Violet | 0.50    | 0.56 | 0.65 | 0.92         |
|     | 21 | Black BN           | 0.07    | 0.02 | 0.06 | 0.09         |
| 鹽基性 | 22 | Rhodamine B        | 0.94    | 0.97 | 0.98 | 0.20         |
|     | 23 | Auramine           | 0.92    | 0.87 | 0.99 | 0.12         |
|     | 24 | Malachite Green    | 0.90    | 0.93 | 0.98 | — * *        |

展開溶媒 (a) n-Butanol : ethanol : N / 2 ammonia (6 : 2 : 3)

(b) n-Butanol : ethanol : N / 2 acetic acid (6 : 2 : 3)

(c) iso-Butanol : ethanol : water (3 : 2 : 2). Then to 99ml of the solution add 1ml of ammonium

(d) Ammonia : water (5 : 95) and dissolve 2g of Trisodium citrate in the solution

\* Quinoline Yellow is sodium salt of a mixture of the mono- and disulfonic acids (mainly the latter) of quinophthalone or 2- (2-quinolyl) indanedione<sup>6</sup>

\* \* 此展開溶媒系鹼性較強,使Malachite Green脫色

其展開所需時間最短且分離效果( $R_f$ 值之順序)與其他展開溶媒迥異,有助於在用其他展開溶媒不易分離時之確認鑑別,如(1)紅色系之Rose Bengale, Phloxine, Acid Red及Erythrosine等四種色素在其他展開溶媒之 $R_f$ 值均較接近,用此展開溶媒之 $R_f$ 值為0.11, 0.20, 0.57及0.03較易鑑別確認。(2)本局承辦案件常遇到之紅色Allura Red AC, Sunset Yellow FCF及Brilliant Blue FCF三種色素混合使用且濃度比例懸殊之檢體,以其他展開溶媒展開時常因 $R_f$ 值相連接而使其中濃度較低之色素被覆蓋而影響鑑別時,用本展開溶媒即迎刃而解,(3)黃色系之Quinoline Yellow及Naphtol Yellow S二

種與使用其他展開溶媒之 $R_f$ 值順序相反且前者分離成二個斑點,有利於其確認鑑別,至於對大部份藍色,綠色系色素之展開分離效果均不佳,且因溶媒本身鹼性較強致使Malachite Green因遇鹼脫色而找不出斑點,只有對Black BN之展開分離效果最好。使用展開溶媒(e)丁酮:丙酮:水(7:3:3)<sup>6</sup>展開時,其 $R_f$ 值在0.01~1.00之間,且大部份的 $R_f$ 值均為1.00,很顯然的對大部份色素的分離效果均不佳。而使用展開溶媒80%乙醇展開時,其大部份色素的展開斑點凝聚性很差,斑點很長,很顯然的分離效果亦不佳。

## 二、薄層層析法

薄層層析法其包含兩個變數:固定相或膜

表二 色素斑點對於酸鹼及螢光反應表

| 色系  | No | 色素名稱               | 自然光 | 10%氨水 | 50%醋酸 | UV 365nm |
|-----|----|--------------------|-----|-------|-------|----------|
| 紅色系 | 1  | New Coccin         | 紅色  | 紅色    | 紅色    | 暗紅紫色     |
|     | 2  | Erythrosine        | 粉紅色 | 粉紅色   | 橙黃色   | 微弱橘紅螢光   |
|     | 3  | Allura Red AC      | 紅色  | 紅色    | 紅色    | 紅色       |
|     | 4  | Amaranth           | 紅紫色 | 紅紫色   | 紅紫色   | 紅紫色      |
|     | 5  | Scarlet GN         | 紅橙色 | 橙黃色   | 紅橙色   | 紅褐色      |
|     | 6  | Rose Bengale       | 紅紫色 | 紅紫色   | 無色    | 弱橘紅螢光    |
|     | 7  | Phloxine           | 粉紅色 | 粉紅色   | 無色    | 強橘黃螢光    |
|     | 8  | Acid Red           | 粉紅色 | 粉紅色   | 粉紅色   | 強橘紅螢光    |
|     | 9  | Azo Rubine         | 紅紫色 | 紅紫色   | 紅紫色   | 鮮紅色      |
|     | 10 | Ponceau SX         | 紅色  | 橙黃色   | 紅色    | 鮮紅色      |
| 黃色系 | 11 | Tartrazine         | 黃色  | 黃色    | 黃色    | 深黃色      |
|     | 12 | Sunset Yellow FCF  | 橙色  | 橙色    | 橙色    | 污紅色      |
|     | 13 | Quinoline Yellow   | 黃色  | 黃色    | 黃色    | 土黃色      |
|     | 14 | Naphthol Yellow S  | 黃色  | 黃色    | 淡~無色  | 黃黑色      |
|     | 15 | Orange II          | 橙色  | 橙色    | 橙色    | 紅色       |
|     | 16 | Metanil Yellow     | 橙色  | 橙色    | 紫色    | 暗紅褐色     |
| 藍色系 | 17 | Fast Green FCF     | 綠色  | 藍紫色   | 綠色    | 藍綠色      |
|     | 18 | Brilliant Blue FCF | 藍色  | 藍色    | 藍色    | 藍色       |
|     | 19 | Indigo Carmine     | 藍色  | 淡黃綠色  | 藍色    | 藍紫色      |
|     | 20 | Patent Blue Violet | 藍色  | 藍色    | 藍色    | 藍色       |
|     | 21 | Black BN           | 藍紫色 | 藍紫色   | 藍紫色   | 藍紫色      |
| 鹽基性 | 22 | Rhodamine B        | 粉紅色 | 粉紅色   | 粉紅色   | 強橘黃螢光    |
|     | 23 | Auramine           | 黃色  | 黃色    | 黃色    | 強橘黃螢光    |
|     | 24 | Malachite Green    | 綠色  | 無色    | 綠色    | 綠色       |

層的性質,移動相或擴張溶媒混合液的展開性質。固定相較常被使用的有:矽膠 (Silica gel), 氧化鋁 (Aluminium oxide), 聚醯胺 (Polyamide) 和纖維素 (Cellulose)。移動相可以是任何一種溶媒,或多種溶媒的混合,在TLC中最困難的問題就是如何選擇適當的溶媒以分離混合物。

#### (一)薄層擔體之選擇

在色素的分離鑑別上,以矽膠為擔體,溶媒展開後,分離效果良好(見表三)。使用氧化鋁擔體展開後,大多數之色素均跑到液前,分離效果不彰;以纖維素為擔體展開時,部份色素停留於原點,部份色素呈現拖尾現象,但也有部份色素分離效果不錯,不過整體而論仍不及矽膠的效果來得好;至於以聚醯胺為擔體展開,大多數的色素均拖尾上昇一些距離,效果也差。經過上述的試驗結果,我們採用矽膠為吸附劑,進行一系列展開溶媒之探討(表三)。

#### (二)展開溶媒系之探討

在吸附薄層上,一般說來,在同一吸附劑上展開溶媒的極性愈大,則對同一化合物的沖提能力也愈大;即在薄層上能把它推進得愈遠,即 $R_f$ 值愈大。因此如果用一種展開溶媒去展開某一化合物,當發現它的 $R_f$ 太小時,就考慮換用一種極性較大的展開溶媒或在原來的展開溶媒中加入一定量另一種極性較大的溶媒去展開。本計劃嚐試了許多展開溶媒,現將展開結果較佳的六種展開溶媒列於表中。

由表三的資料,我們可以很清楚地以色系列之 $R_f$ 值來比較各種溶媒之展開效果。十一種紅色色素部份,當使用溶媒(a)展開時,其 $R_f$ 值介於0.20~0.79之間。其中Allura Red AC與Scarlet GN  $R_f$ 值均為0.50;Erythrosine, Phloxine 及Rhodamine B  $R_f$ 值均為0.76,無法分離。使用溶媒(b)展開時,其 $R_f$ 值介於0.46~0.95之間,而其中有九種色素 $R_f$ 值均在0.80以上,顯然分離效果不是很好—Scarlet GN, Acid Red及Azo Rubine  $R_f$ 值均為0.82;Allura Red AC及Ponceau SX  $R_f$ 值均是0.80。使用溶媒(c)展開時,其 $R_f$ 值介於0.13~0.95之間,除了Allura Red AC及Phloxine  $R_f$ 值均為0.80;Scarlet GN及Ponceau SX  $R_f$ 值相近較

難分離外,效果尚可。使用溶媒(d)展開時,其 $R_f$ 值介於0.21~0.86之間,Amaraanth和Acid Red其 $R_f$ 值均為0.32;Allura Red AC與Scarlet GN  $R_f$ 值均為0.54,使用溶媒(e)展開時,其 $R_f$ 值介於0.70~1.00之間,顯然偏高,分離效果不理想。使用溶媒(f)展開時,其 $R_f$ 值介於0.11~0.92之間,除了Rose Bengale與Rhodamine B  $R_f$ 值均是0.81及New Coccin與Amaraanth  $R_f$ 值亦相近,難以分離外,可說是其中最佳之展開溶媒。綜合上述的討論,以(a).(c).(d).(f)四種溶媒較適用於紅色色素的分離與鑑別。

關於七種黃色色素部份,以溶媒(a)展開時,其 $R_f$ 值介於0.24~0.85之間,可得到完全分離的效果。以溶媒(b)展開時,其 $R_f$ 值介於0.41~0.86之間,其中Quinoline Yellow與Metanil Yellow 位置相近,較難分離。以溶媒(c)展開時,其 $R_f$ 值介於0.10~0.97之間,而Orange II與Metanil Yellow位置相近,難以分離。以溶媒(d)展開時其 $R_f$ 值介於0.32~0.85之間,其中Sunset Yellow FCF與Auramine其 $R_f$ 值均為0.43。以溶媒(e)展開時,其 $R_f$ 值介於0.70~0.91之間,且Quinoline Yellow與Orange II位置相近。以溶媒(f)展開時,其 $R_f$ 值介於0.09~0.82之間,可得到完全分離的效果。上述結果,以溶媒(a)及(f)對黃色色素具有最好的分離效果。

至於六種藍色色素部份,以溶媒(a)展開時,其 $R_f$ 值介於0.12~0.86之間,Brilliant Blue FCF和Indigo Carmine位置相同,無法分離。以溶媒(b)展開時,其 $R_f$ 值介於0.36~0.79之間,而Brilliant Blue FCF和Fast Green FCF位置相同,無法分離。以溶媒(c)展開時,其 $R_f$ 值介於0.07~1.00之間,各色素之間可得到很好的分離效果。以溶媒(d)展開時,其 $R_f$ 值介於0.28~0.88之間,其中有好幾個色素位置均相近,分離的效果最差。以溶媒(e)展開時,分離的效果也不好。以溶媒(f)展開時,其 $R_f$ 值介於0.06~0.92之間,分離效果相當良好。六種溶媒中以(c)及(f)對藍色色素的分離效果最佳。

### 三、高效液相層析法

#### (一)分析條件之探討

在分析過程中,由於配離子之形成使煤焦色素之極性消失,因此採用非極性之 $C_{18}$ 作為固

定相,先以 $10\mu\text{m}$ , $25\text{cm}$ 之 $\mu$ -Bondapak C18<sup>10</sup>進行測試,結果波峰相當寬,分離效果不好,於是改採LichroCART RP-18, $5\mu\text{m}$ <sup>11</sup>,則得非常良好之分離效果。至於波長方面,LOVE指出一般藍色系色素採用 $320\text{nm}$ ,其他色系採 $360\text{nm}$ ,本實驗因係一次同時分離鑑別,於是選用每種煤焦色素皆有吸收之波長 $254\text{nm}$ 進行測試,結果既方便,感度亦佳。

最近已有很多報導利用配離子來分析煤焦色素(郭坤士等,1989<sup>11</sup>,LOVE,1982<sup>12</sup>,Boley et al.,1980<sup>13</sup>),其原理係藉配離子試藥在移動相(水:甲醇)中與煤焦色素形成配離子,大大降低煤焦色素之極性,使能與非極性層析管發生親和力而達到分離效果。常用之試藥有Tetra-butyl ammonium hydroxide (TBAH), Tetra-butyl ammonium bromide (TBAB), Tetra-

表三 薄層層析法六種展開溶媒之 $R_f$ 值

| 色系  | No | 色素名稱               | Rf值      |      |      |      |      |      |
|-----|----|--------------------|----------|------|------|------|------|------|
|     |    |                    | (a)      | (b)  | (c)  | (d)  | (e)  | (f)  |
| 紅色系 | 1  | New Coccin         | 0.20     | 0.46 | 0.17 | 0.21 | 0.73 | 0.11 |
|     | 2  | Erythrosine        | 0.76     | 0.95 | 0.90 | 0.71 | 0.90 | 0.92 |
|     | 3  | Allura Red AC      | 0.50     | 0.80 | 0.80 | 0.54 | 0.83 | 0.35 |
|     | 4  | Amaranth           | 0.33     | 0.69 | 0.13 | 0.32 | 0.70 | 0.12 |
|     | 5  | Scarlet GN         | 0.50     | 0.82 | 0.77 | 0.54 | 0.83 | 0.55 |
|     | 6  | Rose Bengale       | 0.79     | 0.90 | 0.83 | 0.86 | 1.00 | 0.81 |
|     | 7  | Phloxine           | 0.76     | 0.92 | 0.80 | 0.79 | 0.93 | 0.86 |
|     | 8  | Acid Red           | 0.59     | 0.82 | 0.59 | 0.32 | 0.80 | 0.28 |
|     | 9  | Azo Rubine         | 0.48     | 0.82 | 0.23 | 0.54 | 0.73 | 0.57 |
|     | 10 | Ponceau SX         | 0.65     | 0.80 | 0.78 | 0.36 | 0.73 | 0.46 |
| 黃色系 | 11 | Tartrazine         | 0.24     | 0.41 | 0.10 | 0.32 | 0.70 | 0.09 |
|     | 12 | Sunset Yellow FCF  | 0.46     | 0.65 | 0.47 | 0.43 | 0.77 | 0.30 |
|     | 13 | Quinoline Yellow   | 0.75     | 0.75 | 0.90 | 0.80 | 0.89 | 0.57 |
|     | 14 | Naphthol Yellow S  | 0.42     | 0.68 | 0.67 | 0.65 | 0.81 | 0.38 |
|     | 15 | Orange II          | 0.85     | 0.86 | 0.82 | 0.83 | 0.89 | 0.54 |
|     | 16 | Metanil Yellow     | 0.71     | 0.76 | 0.83 | 0.85 | 0.91 | 0.61 |
| 藍色系 | 17 | Fast Green FCF     | 0.35     | 0.74 | 0.17 | 0.34 | 0.72 | 0.08 |
|     | 18 | Brilliant Blue FCF | 0.50     | 0.74 | 0.63 | 0.35 | 0.81 | 0.11 |
|     | 19 | Indigo Carmine     | 0.50     | 0.54 | 0.37 | 0.46 | 0.81 | 0.17 |
|     | 20 | Patent Blue Violet | 0.21~0.3 | 0.68 | 0.23 | 0.28 | 0.50 | 0.14 |
|     | 21 | Black BN           | 0.12     | 0.36 | 0.07 | 0.33 | 0.72 | 0.06 |
| 鹽基性 | 22 | Rhodamine B        | 0.76     | 0.85 | 0.95 | 0.43 | 0.86 | 0.81 |
|     | 23 | Auramine           | 0.82     | 0.80 | 0.97 | 0.43 | 0.86 | 0.82 |
|     | 24 | Malachite Green    | 0.86     | 0.79 | 1.00 | 0.88 | 0.92 | 0.92 |

展開溶媒 (a) : iso-Propanol : ammonia (4 : 1)

(b) : n-Butanol : acetic acid : water (10 : 5 : 6)

(c) : Ethyl acetate : methanol : ammonia (3 : 1 : 1)

(d) : n-Amyl alcohol : ethanol : ammonia (10 : 10 : 1)

(e) : Methanol : ethanol : iso-amyl alcohol : ammonia (15 : 10 : 5 : 3)

(f) : Acetone : methyl ethyl ketone : ammonia : water (60 : 140 : 1 : 60)

rahexyl ammonium bromide (THAB), Cetyl trimethyl ammonium Bromide (Cetrimide)及Tetrabutyl ammonium phosphate (TBAP)等, Cetrimide因容易滯留在層析管中,影響其壽命,故不予採用,另外THAB必須調整pH值,操作較不方便。本實驗乃參考桑野和民<sup>14</sup>之報告利用0.005M TBAP與甲醇之混合液採線性梯度遞變來分離二十一種酸性煤焦色素,同時利用帶負電荷PSA與甲醇之混合液來分離三種帶正電荷之鹽基性煤焦色素。

有關溶媒之pH值及層析管之溫度方面,郭坤土等曾以pH5.7,6.7,7.7及溫度15,25,35,45℃作一系列之探討,其所採用之配離子溶液為0.01M TBAH,結果以pH 7.7,溫度25℃最理想。本方法之配離子溶液為0.005M TBAP,其pH不需調整即為7.5,於是參照上述實驗報告,在室溫下進行溶媒比率之探討。首先0.005M TBAP與甲醇在固定比率(50:50,40:60,30:70等)下,將酸性煤焦色素個別注入,尋找各個色素最好之分離條件,最後再將色素混合,以梯度遞變方式一次分離。至於鹽基性色素部份,則利用pH值3.5之0.005M PSA與甲醇之混合液,以不同比率進行探討,結果以0.005M PSA:甲醇(15:85)之比率最理想。

#### (二)儀器之檢測

將二十一種酸性煤焦色素各100ppm之混合溶液,取10 $\mu$ l行液相層析分析,利用逆相層析管分離,移動相溶媒由溶媒梯度控制器配液,在16分鐘內,含0.005M TBAP之水溶液(A液),依線性遞減方式由55%遞減至41%,同時甲醇(B液)依線性遞增方式,由45%遞增至59%,保持2分鐘,接著在4分鐘內,A液由41%遞減至0%,B液由59%遞增至100%,並繼續保持4分鐘之溶離,於波長254nm進行檢測,在此條件下26分鐘內分離食用藍色二號等二十一種酸性煤焦色素,其層析圖譜如圖一,分離效果非常良好,再現性也不錯。另外八種規定內煤焦色素及三種鹽基性煤焦色素之層析圖譜及分析條件如圖二及圖三。由圖譜顯示大體上紅色色系之敏感度較佳,黃色,藍色系次之(Indigo Carmine例外)——而酸性煤焦色素又較鹽基性好,唯Rhodamine B例外。

#### 四、三種方法之檢出限量

每種色素分別配製成100ppm,100ppm及1ppm之濃度進行PC,TLC及HPLC三種方法檢出限量之測試,經檢測結果比較分列如表四。PC部份,以紅色色系敏感度最好,黃色較差——TLC則黃色色系敏感度較差——至於HPLC方面,酸性煤焦色素以Indigo Carmine最佳,Brilliant Blue FCF最差,紅色色系亦不錯,但因滯留時間太長,以至於儀器敏感度提高時,受梯度遞變之影響,最後基線漂移,導至Erythrosine, Rose Bengale 及Phloxine之檢出限量高達15ng。由此可知三種分離鑑別方法之敏感度,TLC約為PC之二倍,HPLC又為TLC之十倍~二十倍之間,其中以Auramine敏感度最差,Rhodamine B最好。

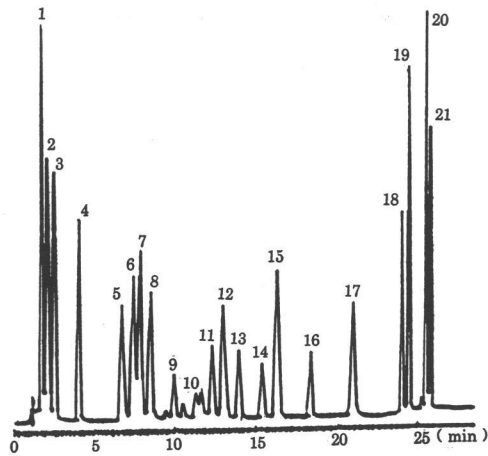
#### 五、應用本方法分析市售食品

利用所建立之方法進行市售檢體之檢驗,按照標示或色澤,選擇濾紙及薄層層析適當之展開溶媒,同時利用色素對酸鹼及螢光反應之特性,予以輔助鑑別。進一步利用高效液相層析法之高敏感度檢驗色素濃度較低之檢體。

檢體樣品均購自全省各地超級市場及傳統市場,包括國產食品52件,進口食品18件,共計70件。經檢驗結果,使用規定外煤焦色素之檢體,國產食品8件,進口食品1件,共計9件,佔12.86%(見表五)。其中進口食品生菓子檢體檢出Phloxine,此乃輸入國法規與我國規定不符所致。抽購五件鹹魚檢體中,一件有Orange II,一件有Metanil Yellow,另外三件則檢出Orange II及Metanil Yellow兩種,全部與規定不符,黃豆乾亦檢出Orange II及Metanil Yellow兩種,可見規定外煤焦色素亦被混合添加使用,另外抽購三件話梅檢體中,其中一件檢出Orange II,脆圓中則發現有鹽基性色素Rhodamine B。除了上述9件以外,其餘61件檢體均與規定相符,佔87.14%。

#### 六、結論

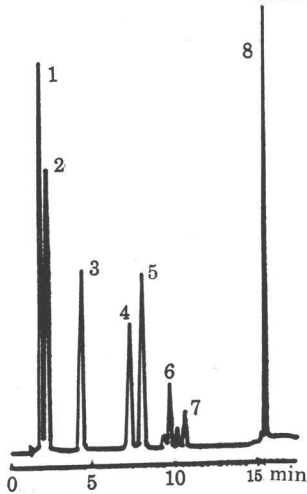
有關色素之檢驗,公告方法有濾紙層析法及薄層層析法兩種,兩方法之操作簡便,費用經濟,但是斑點容易消褪,無法長期保存,而且僅能鑑別,不能定量為其缺點。薄層層析法之斑點凝聚性及敏感度皆較濾紙層析法為佳,日本衛生



圖一 二十一種酸性煤焦色素之層析圖譜

HPLC condition : column, LichroCART RP-18, 5 $\mu$ m, (4mmX12.5cm), mobile phase system (A) 0.005 M tetrabutyl ammonium phosphate & (B) MeOH, gradient program, A : B=55 : 45 $\rightarrow$  A : B=41 : 59 / 16min hold 2min, A : B=41 : 59 $\rightarrow$  A : B=0 : 100 / 4min, curve \* 6, flow rate, 1ml / min, detector, 154nm, injection quantity of dyes, 1 $\mu$ g respectively.

- |                      |                        |
|----------------------|------------------------|
| 1. Indigo Carmine    | 2. Tartrazine          |
| 3. Amaranth          | 4. Sunset Yellow FCF   |
| 5. Allura Red AC     | 6. New Coccin          |
| 7. Naphthol Yellow S | 8. Black BN            |
| 9. Fast Green FCF    | 10. Brilliant Blue FCF |
| 11. Scarlet GN       | 12. Quinoline Yellow   |
| 13. Azo Rubine       | 14. Patent Blue V      |
| 15. Acid Red         | 16. Ponceau SX         |
| 17. Orange II        | 18. Metanil Yellow     |
| 19. Erythrosine      | 20. Phloxine           |
| 21. Rose Bengale     |                        |



圖二 八種酸性煤焦色素之層析圖譜

HPLC condition : column, LichroCART RP-18, 5 $\mu$ m (4mmX12.5cm), mobile phase system (A) 0.005M tetrabutyl ammonium phosphate, A : B=56 : 44 $\rightarrow$  A : B=40 : 60 / 10min, A : B=40 : 60 $\rightarrow$  A : B=0 : 100 / min, curve \* 6, flow rate, 1ml / min, detector, 254nm, quantity of dyes, 1 $\mu$ g respectively.

1. Indigo Carmine 2. Tartrazine 3. Sunset Yellow FCF 4. Allura Red AC 5. New Coccin  
6. Fast Green FCF 7. Brilliant Blue FCF  
8. Erythrosine



圖三 三種鹽基性煤焦色素之層析圖譜

HPLC condition : column, LichroCATR RP-18 5 $\mu$ m (4mmX12.5cm), mobile phase system (A) 0.005M Pentane sulfonic acid : (B) MeOH=15 : 85, flow rate, 1ml / min, detector 254nm, injection quantity of dyes, 1 $\mu$ g respectively.

1. Rhodamine B  
2. Auramine  
3. Malachite Green

試驗法注解(1990)已將濾紙層析法取消,僅收載薄層層析法,擬建議公告方法是否可朝薄層層析法之方向擬定修正。至於高效液相層析法,除了可確認鑑別外,尚可利用其高感度檢驗色素濃度較低之檢體,同時兼具定量之功能,另外層析圖譜又可長期保存,供作檢驗依據。唯其設備昂貴,移動相所需之溶媒耗資較多。

綜合以上探討結果,三種分離鑑別方法之理想條件分別如下:

(一)濾紙層析條件

展開溶媒有下列四種:

正丁醇:乙醇:N / 2氨水(6:2:3)

正丁醇:乙醇:N / 2醋酸(6:2:3)

異丁醇:乙醇:水(3:2:2)之溶液99ml中加氨水1 ml

氨水:水(5:95)之溶液100ml中含檸檬酸鈉2g

(二)薄層層析條件

展開溶媒有下列六種:

異丙醇:氨水(4:1)

正丁醇:醋酸:水(10:5:6)

醋酸乙酯:甲醇:氨水(3:1:1)

正戊醇:乙醇:氨水(10:10:1)

甲醇:乙醇:異戊醇:氨水(15:10:5:3)

丙酮:丁酮:氨水:水(60:140:1:60)

表四 PC, TLC及HPLC三種方法之檢出限量 (ng)

| 色系  | No | 色素名稱               | PC * | TLC * | HPLC |
|-----|----|--------------------|------|-------|------|
| 紅色系 | 1  | New Coccin         | 100  | 50    | 3    |
|     | 2  | Erythrosine        | 100  | 50    | 15   |
|     | 3  | Allura Red AC      | 100  | 50    | 2    |
|     | 4  | Amaranth           | 100  | 50    | 2    |
|     | 5  | Scarlet GN         | 100  | 50    | 5    |
|     | 6  | Rose Bengale       | 100  | 50    | 15   |
|     | 7  | Phloxine           | 100  | 50    | 15   |
|     | 8  | Acid Red           | 50   | 50    | 2    |
|     | 9  | Azo Rubine         | 100  | 50    | 5    |
|     | 10 | Ponceau SX         | 100  | 50    | 5    |
| 黃色系 | 11 | Tartrazine         | 100  | 100   | 2    |
|     | 12 | Sunset Yellow FCF  | 100  | 50    | 2    |
|     | 13 | Quinoline Yellow   | 100  | 100   | 3    |
|     | 14 | Naphthol Yellow S  | 100  | 100   | 2    |
|     | 15 | Orange II          | 100  | 50    | 3    |
|     | 16 | Metanil Yellow     | 100  | 50    | 5    |
| 藍色系 | 17 | Fast Green FCF     | 100  | 50    | 5    |
|     | 18 | Brilliant Blue FCF | 100  | 50    | 10   |
|     | 19 | Indigo Carmine     | 100  | 50    | 2    |
|     | 20 | Patent Blue Violet | 100  | 50    | 5    |
|     | 21 | Black BN           | 100  | 50    | 3    |
| 鹽基性 | 22 | Rhodamine B        | 50   | 50    | 1    |
|     | 23 | Auramine           | 1000 | 500   | 50   |
|     | 24 | Malachite Green    | 100  | 50    | 7    |

\* PC及TLC係以肉眼目測能見之清晰斑點之濃度

表五 市售食品中規定外煤焦色素之檢出情形

| 檢體名稱  | 國別 | 件數 | 規定外煤焦色素                    |
|-------|----|----|----------------------------|
| 生 菜 子 | 日本 | 1  | Phloxine                   |
| 鹹 魚   | 本國 | 1  | Orange II                  |
| 鹹 魚   | 本國 | 1  | Metanil Yellow             |
| 鹹 魚   | 本國 | 3  | Orange II 及 Metanil Yellow |
| 黃 豆 乾 | 本國 | 1  | Orange II 及 Metanil Yellow |
| 威士忌話梅 | 本國 | 1  | Orange II                  |
| 脆 圓   | 本國 | 1  | Rhodamine B                |

### (三)高效液相層析條件

分離管:LichroCART RP-18.5 $\mu$ m  
(4mm $\times$ 12.5cm)

紫外線檢出器:UV 254nm

流速:1ml/min

移動相:

1. 酸性煤焦色素:採線性梯度遞變(linear gradient)

A液:0.005M TBAP

B液:甲醇

梯度程式(gradient program):曲線-6

(1)二十一酸性煤焦色素:

A:B=55:45 $\rightarrow$ A:B=41:59 / 16分 維持2

分

A:B=41:59 $\rightarrow$ A:B=0:100 / 4分

(2)八種規定內煤焦色素:

A:B=56:44 $\rightarrow$ A:B=40:60 / 10分

A:B=40:60 $\rightarrow$ A:B=0:100 / 1分

2. 鹽基性煤焦色素:

0.005M PSA : 甲醇(15:85)

### 參考文獻

1. 蔡英一,王素蘭.1987.臺灣地區兒童食品中煤焦色素之調查.藥物食品檢驗局調查研究年報.5:248-249.
2. 溫惠琴,陳炳宗,沈孜徽,楊仕喜,林錦英.1988.民俗食品中著色劑及防腐劑之調查.藥物食品檢驗局調查研究年報.6:173-175.
3. 朱華,李樹其.1988.進口糖果,餅乾等之著色劑,人工甘味劑,防腐劑及其標示之調查.藥

物食品檢驗局調查研究年報.6:170-172.

4. 食品添加物公定書解說書編輯委員會.1987.日本食品添加物公定書第五版:H28-31及B-126.

5. 經濟部中央標準局.1989.食品中色素之檢驗法.中國國家標準10889 N 6185號.

6. Pearson, D. 1973. The Identification of EEC Food Colours. J. A. P. A. 11:127-134.

7. 臺灣省衛生試驗所.1958.衛生試驗法(第一輯):6-8頁.

8. 日本藥學會.1990.著色料.日本衛生試驗法・註解.P.500-547.金原出版株式會社.東京.

9. Pearson, D. 1973. The Identification of EEC Food Colours using Standardised TLC Plates. J. A. P. A. 11:135-138.

10. McKone, H. T. 1980. An Introduction to High Performance Liquid Chromatography: Separation of Some FD&Dyes. Journal of Chemical Education 57:321-322.

11. Kung Tu kuo (郭坤土), Yung Chung Lin (林永忠). 1989. Study on HPLC Method to Analyze and Identify the Dyes Contained in Foods. Analytical Chemistry: 114. International Chemistry Conference, Taipei.

12. Love, J. L. 1982. Synthetic Colour use in New Zealand Foods. New Zealand Journal of Science 25:27-36.

13. Boley, N. P. Bunton, N. G. Crosby, N. T. Johnson, A. E. Roper, P. and Somers, L. 1980. Determinations of Synthetic Colours in Foods using High Performance Liquid Chromatography. Analyst 10(June):589-599.
14. 桑野和民. 1985. イオン對高速液体クロマトグラフィーによる食用色素の分離定量. 食衛誌. 27(3):278-282.

## SEPARATION AND IDENTIFICATION OF ILLEGAL COAL TAR DYES IN FOOD

JYUHN-LURNG CHERNG, CHUN-TZU HUANG, SHU-JU SU  
AND SHU-CHI LEE

DIVISION OF FOOD CHEMISTRY

### ABSTRACT

The methods of paper chromatography (PC), thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC) were studied to separate and identify 8 regulative 16 illegal coal tar dyes. The conditions of dye separation by PC, TLC and HPLC were as follow : (1) PC : Toyo filter paper No.50 and four developing systems. (2) TLC : Silica gel plate and six developing systems. (3) HPLC : column, Lichro CART RP-18, 5  $\mu$ m, mobil phase systems : (a) 0.005M tetrabutyl ammonium phosphate

and methanol with linear gradient for acid coal tar dyes. (b) 0.005M pentane sulfonic acid and methanol (85 : 15) for basic coal tar dyes, detector, 254nm. The HPLC method is superior than PC and TLC methods in term of speed and sensitivity. Using these three methods, the contents of dyes were effectively investigated in 70 commercial food samples. The results showed that illegal coal dyes were detected in 9 samples (12.86%).