

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°C 可達 18 MΩ·cm 以上)。
 - 2.1.2. 試劑之調製：
 - 2.1.2.1. 80%乙醇溶液：

取乙醇與去離子水，以 80：20 (v/v) 之比例混勻。
 - 2.1.2.2. 70%乙醇溶液：

取乙醇與去離子水，以 70：30 (v/v) 之比例混勻。
 - 2.1.2.3. 含 1%氨水之 70%乙醇溶液：

取氨水 4 mL，加 70%乙醇溶液使成 100 mL。
 - 2.1.2.4. 含 1%醋酸之 70%乙醇溶液：

取醋酸 1 mL，加 70%乙醇溶液使成 100 mL。
 - 2.1.2.5. 10%氨水溶液：

取氨水 40 mL，加去離子水使成 100 mL。
 - 2.1.2.6. 25%氯化鈉溶液：

稱取氯化鈉 25 g，加去離子水溶解使成 100 mL。
 - 2.1.2.7. 6%醋酸溶液：

取醋酸 6 mL，加去離子水使成 100 mL。
 - 2.1.3. 試驗溶液之調製：
 - 2.1.3.1. 液狀檢體(酒精飲料、清涼飲料及液狀調味品等)：

依著色程度稱取檢體 20~200 mL，加適量去離子水作為試驗溶液，檢體含乙醇者，先中和呈中性後，置於水浴上去除乙醇，再加去離子水至原容量作為試驗溶液。
 - 2.1.3.2. 糖果、糕餅及農產品：

依著色程度稱取檢體 20~200 g，研碎或切碎，按下列方法製成試驗溶液。
 - 2.1.3.2.1. 糖果等製品：

檢體加入約 5 倍量之熱去離子水，溶解後作為試驗溶液，檢體僅表面著色時，取著色部分調製之。
 - 2.1.3.2.2. 醃漬蔬果類：

檢體加入約 4~5 倍量之 80%乙醇溶液，振搖混合，放置 2~3 小時後，取浸出液，檢體再以含 1%氨水之 70%乙醇溶液一次或數次反覆浸出，合併浸出液，以 6%醋酸溶液中和。置於水浴上去除大部分乙醇，再加去離子水至原容量作為試驗溶液，檢體仍著色時，再以含 1%醋酸之 70%乙醇溶液一次或數次反覆浸出，合併浸出液，以 10%氨水溶液中和，蒸發去除乙醇，加去離子水至原容量作為試驗溶液。

2.1.3.2.3. 果凍、果醬、味噌及餡等食品：

檢體加入約 3~5 倍量之熱去離子水，混合放置後以玻璃棉或石棉過濾，取濾液作為試驗溶液，色素無法抽出時，應按照 2.1.3.2.2. 節之方法調製。

2.1.3.2.4. 巧克力、可可及奶油等製品：

將檢體置於大型濾紙上或裝入燒杯，以乙醚經數次洗滌脫脂，檢體上殘留之乙醚以乾燥濾紙吸附或使之自然風乾，再依 2.1.3.2.2. 節之方法調製試驗溶液。

2.1.3.2.5. 穀類製品：

檢體加入約 5 倍量之 80%乙醇溶液，放置 24 小時並時時振搖，靜置後取浸出液於水浴上蒸發濃縮至原容量 1/5，再加入約 1/4 容量之 25%氯化鈉溶液，並加 10%氨水溶液使呈鹼性，移入分液漏斗中，用同量之石油醚振搖脫脂數次後，取下層液以 6%醋酸溶液中和，作為試驗溶液。石油醚層著色時，應以 6%醋酸溶液混合振搖萃取，取出醋酸層中和後，併入前項試驗溶液。

2.1.3.2.6. 口香糖類：

檢體加入約 5 倍量之去離子水煮沸，冷卻過濾後，取著色濾液作為試驗溶液，檢體仍著色或濾液未著色時，添加 10%氨水溶液使呈中性或微鹼性，再煮沸，冷卻過濾後，取濾液併入前項試驗溶液。

2.1.3.3. 水產及畜產食品：

依著色程度稱取檢體 20~200 g，依 2.1.3.2.4. 節之方法調製試驗溶液。

2.2. 毛線染色分離鑑別法

2.2.1. 濾紙層析法(Paper chromatography)

2.2.1.1. 裝置：

2.2.1.1.1. 展開槽。

2.2.1.1.2. 紫外燈：波長 254 nm 及 365 nm (或 375 nm)。

2.2.1.2. 試藥：醋酸、氨水(25%)、正丁醇、乙醇、丙酮及異戊醇均採用試藥級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18

MΩ·cm 以上)；食用紅色六號(New Coccine)、食用紅色七號(Erythrosin)、食用黃色四號(Tartrazine)、食用黃色五號(Sunset Yellow FCF)、食用藍色一號(Brilliant Blue FCF)、食用藍色二號(Indigo Carmine)、食用綠色三號(Fast Green FCF)及食用紅色四十號(Allura Red AC)對照用標準品。

2.2.1.3. 器具及材料：

2.2.1.3.1. 濾紙：層析用濾紙。

2.2.1.3.2. 毛細管或微量吸管。

2.2.1.3.3. 容量瓶：100 mL。

2.2.1.3.4. 分液漏斗。

2.2.1.3.5. 燒杯。

2.2.1.3.6. 毛線：應選用脫脂且不含螢光物質之未著色純毛毛線，否則應按下列步驟處理。

(1) 脫脂：利用索式(Soxhlet)抽出器，以石油醚將毛線充分脫脂後，取出毛線，於室溫下去除石油醚，以去離子水充分沖洗後，輕輕榨壓後風乾。

(2) 脫螢光物質：取脫脂毛線 10 g，置於燒杯中，加氨水 1~4 mL，並加適量去離子水浸淹，而後置於 45°C 水浴中溫浸 30~60 分鐘時時攪拌。取出毛線後，再置入稀氨水溶液中，充分攪拌。再取出毛線，先用溫去離子水，次用冷去離子水充分沖洗，輕輕榨壓後風乾。

2.2.1.4. 試劑之調製：

2.2.1.4.1. 稀氨水溶液：

取氨水 1 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.2.1.4.2. 1N 醋酸溶液：

取醋酸 6 g，加去離子水使成 100 mL。

2.2.1.4.3. 0.5N 醋酸溶液：

1N 醋酸溶液以去離子水稀釋 2 倍。

2.2.1.4.4. 5%氨水溶液：

取氨水 20 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.2.1.4.5. 1%氨水溶液：

5%氨水溶液以去離子水稀釋 5 倍。

2.2.1.4.6. 10%醋酸溶液：

取醋酸 10 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.2.1.4.7. 0.5N 氨水溶液：

取氨水 7 mL，加去離子水使成 100 mL。

2.2.1.4.8. 25%乙醇溶液：

取乙醇與去離子水，以 25：75 (v/v) 之比例混勻。

2.2.1.5. 展開溶媒：

- (1) 正丁醇：乙醇：0.5N 氨水溶液(6:2:3, v/v/v)。
- (2) 正丁醇：乙醇：0.5N 醋酸溶液(6:2:3, v/v/v)。
- (3) 丙酮：異戊醇：去離子水(6:5:5, v/v/v)。
- (4) 25%乙醇溶液：5%氨水溶液(1:1, v/v)。

2.2.1.6. 標準溶液之配製：

取食用紅色六號等 8 項對照用標準品各約 100 mg，精確稱定，共置於 100 mL 容量瓶中，以去離子水溶解並定容，使其濃度為 0.1%，供作標準溶液。

2.2.1.7. 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。

2.2.1.8. 鑑別試驗：

取濾紙於其下端約 2~4 cm 處用鉛筆畫一橫線，沿橫線每隔 1.5~2 cm 處，以毛細管或微量吸管依次分別點上直徑約 0.5 cm 圓點之各檢液及標準溶液並風乾之。而後置入盛有展開溶媒之展開槽內，濾紙需垂直，且不得碰到槽壁，使展開溶媒浸沒濾紙下端約 1 cm 處，密蓋之。展開溶媒浸潤上昇至約 13~25 cm 處，取出風乾，依檢液上昇之斑點的位置和顏色與標準溶液比較鑑別之。必要時得於紫外燈照射下觀察，作進一步鑑定。

2.2.2. 薄層層析法(Thin layer chromatography)

2.2.2.1. 裝置：

2.2.2.1.1. 展開槽。

2.2.2.1.2. 紫外燈：同 2.2.1.1.2. 節。

2.2.2.2. 試藥：醋酸、氨水(25%)、醋酸乙酯、乙醇、正戊醇、丁酮(methyl ethyl ketone)、2-甲氧基乙醇(ethylene glycol monomethyl ether)、甲醇及異戊醇均採用試藥級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；食用紅色六號(New Coccine)等同 2.2.1.2. 節之 8 項對照用標準品。

2.2.2.3. 器具及材料：

2.2.2.3.1. 毛細管或微量吸管。

2.2.2.3.2. 分液漏斗。

2.2.2.3.3. 毛線：同 2.2.1.3.6.節

2.2.2.3.4. 薄層層析板：矽膠，厚度 0.2 mm，20 × 20 cm。

2.2.2.4. 試劑之調製：

2.2.2.4.1. 1N 醋酸溶液：同 2.2.1.4.2.節。

2.2.2.4.2. 1% 氨水溶液：同 2.2.1.4.5.節。

2.2.2.4.3. 10% 醋酸溶液：同 2.2.1.4.6.節。

2.2.2.5. 展開溶媒：

(1) 醋酸乙酯：甲醇：氨水(4:5:1 或 3:1:1, v/v/v)。

(2) 正戊醇：乙醇：氨水(10:10:1, v/v/v)。

(3) 丁酮：2-甲氧基乙醇：乙醇：氨水(20:15:12:1, v/v/v/v)。

(4) 甲醇：乙醇：異戊醇：氨水(15:10:5:3, v/v/v/v)。

2.2.2.6. 標準溶液之配製：同 2.2.1.6.節。

2.2.2.7. 檢液之調製：同 2.2.1.7.節。

2.2.2.8. 鑑別試驗：

沿矽膠薄層板下端 2 cm 之橫向，每隔 1 cm 分別點上直徑約 0.3 cm 之檢液及標準溶液，並風乾之。而後置入盛有展開溶媒之展開槽內，使展開溶媒浸沒薄層板下端 0.5~1 cm，展開高度達 8~15 cm 後取出風乾，依檢液上昇之斑點的位置及顏色與標準溶液比較鑑別之，必要時得於紫外燈照射下觀察，作進一步鑑定。

2.2.3. 高效液相層析法(High performance liquid chromatography)

2.2.3.1. 裝置：

2.2.3.1.1. 高效液相層析儀：

2.2.3.1.1.1. 檢出器：光二極體陣列檢出器(photodiode array detector)。

2.2.3.1.1.2. 層析管：Atlantis T3，3 μm，內徑 2.1 mm × 10 cm，或同級品。

2.2.3.2. 試藥：醋酸及氨水(25%)均採用試藥級；磷酸(85%)、磷酸氫二銨(diammonium hydrogen phosphate)及磷酸二氫銨(ammonium dihydrogen phosphate)均採用試藥特級；甲醇採用液相層析級；去離子水(比電阻於 25°C 可達 18 MΩ·cm 以上)；食用紅色六號(New Coccine)等同 2.2.1.2.節之 8 項對照用標準品。

2.2.3.3. 器具及材料：

2.2.3.3.1. 容量瓶：100 mL 及 1000 mL。

2.2.3.3.2. 濾膜：孔徑 0.45 μm，Nylon 材質。

2.2.3.4. 試劑之調製：

2.2.3.4.1. 1N 醋酸溶液：同 2.2.1.4.2. 節。

2.2.3.4.2. 1% 氨水溶液：同 2.2.1.4.5. 節。

2.2.3.4.3. 10% 醋酸溶液：同 2.2.1.4.6. 節。

2.2.3.4.4. 1M 磷酸溶液：

取磷酸 67.4 mL，加去離子水使成 1000 mL。

2.2.3.5. 移動相溶液之調製：

2.2.3.5.1. 移動相溶液 A：

稱取磷酸二氫銨 1.15 g 及磷酸氫二銨 1.32 g，以去離子水溶解使成 1000 mL，以 1M 磷酸溶液調整 pH 值至 6.0，以濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液 A。

2.2.3.5.2. 移動相溶液 B：甲醇。

2.2.3.6. 標準溶液之配製：

取食用紅色六號等 8 種對照用標準品各約 100 mg，精確稱定，共置於 100 mL 容量瓶中，以去離子水溶解並定容，作為標準原液。臨用時以去離子水稀釋至 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

2.2.3.7. 檢液之調製：

依 2.2.1.7. 節調製之溶液，以濾膜過濾後，供作檢液。

2.2.3.8. 鑑別試驗：

精確量取檢液及標準溶液各 10 μL ，分別注入高效液相層析儀中，依下列條件進行液相層析，就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間及吸收圖譜比較鑑別之。

高效液相層析測定條件：

光二極體陣列檢出器：波長 254 nm。

層析管：Atlantis T3，3 μm ，內徑 2.1 mm \times 10 cm。層析管溫度：30 $^{\circ}\text{C}$ 。

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 \rightarrow 4	90 \rightarrow 50	10 \rightarrow 50
4 \rightarrow 8	50 \rightarrow 40	50 \rightarrow 60
8 \rightarrow 12	40 \rightarrow 20	60 \rightarrow 80
12 \rightarrow 12.1	20 \rightarrow 90	80 \rightarrow 10
12.1 \rightarrow 15	90 \rightarrow 90	10 \rightarrow 10

移動相流速：0.7 mL/min。

附註：

1. 食品中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。
2. 以液相層析串聯質譜儀(LC/MS/MS)進行確認時，其多重反應偵測(multiple reaction monitoring, MRM)模式參考參數如附表。

附表、食用紅色六號等 8 項著色劑之液相層析串聯質譜儀多重反應偵測模式參數

分析物	電灑離子化模式	定量離子對			定性離子對		
		前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)	前驅離子(m/z) > 產物離子(m/z)	去簇電壓 (V)	碰撞能量 (eV)
食用紅色六號	ESI ⁻	268 > 206	-25	-18	206 > 80	-35	-40
食用紅色七號	ESI ⁻	834 > 127	-80	-84	834 > 227	-80	-91
食用黃色四號	ESI ⁻	244 > 80	-21	-62	244 > 198	-21	-20
食用黃色五號	ESI ⁻	407 > 207	-57	-41	407 > 80	-57	-108
食用藍色一號	ESI ⁻	373 > 170	-45	-42	373 > 80	-45	-92
食用藍色二號	ESI ⁻	226 > 198	-42	-27	226 > 105	-42	-53
食用綠色三號	ESI ⁻	381 > 170	-40	-38	381 > 341	-40	-25
食用紅色四十號	ESI ⁻	225 > 136	-32	-34	225 > 80	-32	-59

註：上述參數不適時，依所使用之儀器，設定適合之參數。