

## 米製品中羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑鑑別方法之建立

郭景豪 方銘志 蔡佳芬 高雅敏 王德原 陳惠芳

食品藥物管理署研究檢驗組

### 摘要

台灣傳統米製品如紅龜粿、紅湯圓往往添加紅色著色劑，以代表喜氣吉祥。但業者違法使用羅丹明B (俗稱「紅花米」)之事件卻時有所聞，顯示這些違法著色劑常有誤用或蓄意使用之情形。依衛生福利部102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正之「食品中著色劑之檢驗方法」之毛線染色步驟可檢測含酸性色素之檢體，但鹽基性煤焦色素如羅丹明B則不易著色於毛線上，而有漏失之可能；因此本研究建立以高效液相層析儀(High performance liquid chromatograph, HPLC)搭配光二極體陣列檢出器(Photodiode array detector)鑑別分析米製品中4項著色劑，包括羅丹明B (Rhodamine B)、酸性紅(Food red No. 106, acid red)、夾竹桃紅(Phloxine B)及偶氮玉紅(Azorubine)。檢體經萃取，以丙酮沉澱除去多醣基質後，改進了傳統毛線染色法操作上不易染色之缺點。試驗結果，4種著色劑之偵測極限均為0.1 ppm。依所建立之方法進行6件市售檢體(3件紅龜粿及3件麻糬)之羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑分析，結果均未檢出。

**關鍵詞：**米製品、紅龜粿、羅丹明B、著色劑、HPLC

### 前言

為了讓食物垂涎欲滴，除了口感與香味，更要有吸引人的顏色，因此食品添加物中著色劑佔有一席之地。而食品中添加規定外著色劑，其使用效果較法定8項食用著色劑更具有優勢，有穩定性高及呈色漂亮之特點，使得不肖廠商違法使用。

羅丹明B (Rhodamine B)又稱玫瑰紅B或玫瑰精B、鹽基性桃紅精(紅花米)，為鹽基性煤焦色素，具有強烈螢光反應，廣泛應用於各類螢光染劑，但不得使用於食品<sup>(1)</sup>。近年來新聞事件卻見湯圓、包子等常見食品中使

用羅丹明B作為著色劑的新聞，顯示廠商仍存有違法使用之情形。目前國際癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)將羅丹明B歸類為第三類致癌物，即有一些對動物致癌的證據，但對人體致癌性的研究不夠充分，無法判定為會對人類致癌<sup>(2)</sup>。另WHO於1983年確定了偶氮玉紅(Azorubine)沒有誘變或致癌性質的證據，可接受的每日容許攝取量(Acceptable daily intake, ADI)為0 - 4 mg/kg b.w./day<sup>(3)</sup>。美國食品藥物管理局認為夾竹桃紅(Phloxine B)對人體的安全容許量高達每日1.25 mg/kg b.w.。就風險評估角度而言，偶然食入，對於人體健康的危害性不大，但如果

經常性攝入，仍可能會造成身體的負擔<sup>(4)</sup>。因此，為了確保消費者之健康，本研究進行米製品中羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑鑑別方法之探討。

常見之食品中著色劑檢驗方法，包括直接以溶劑萃取、經液液萃取或固相萃取等方式，再配合液相層析法搭配紫外光、螢光或質譜檢測器進行檢測<sup>(5-10)</sup>。此外，食品檢體中羅丹明B之分析，利用非極性溶劑將檢體中羅丹明B萃取出後，即可進行儀器分析。但是食品檢體複雜程度不一，高醣類、高油脂及高蛋白質等情形可能導致萃取率不佳，因而有必要進一步發展簡便合宜之檢驗方法，來快速檢測食品中羅丹明B、酸性紅(Food red No. 106, acid red)、夾竹桃紅及偶氮玉紅。本研究建立高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器分析米製品中著色劑，包括羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅4種著色劑之鑑別方法，並進行市售紅龜粿檢體中著色劑之調查監測。

## 材料與方法

### 一、檢體來源

本研究所使用之檢體係由市場及大賣場取得，共3件紅龜粿及3件麻糬。

### 二、試藥

(一)對照標準品：羅丹明B(純度95%)、酸性紅(純度95%)、夾竹桃紅(純度80%)及偶氮玉紅(純度98%) (均為Sigma-Aldrich, USA)

(二)溶劑與藥品：甲醇及乙腈(LC級) (均為Merck Millipore, USA)、正己烷(LC級) (Avantor Performance Materials, USA)、氨水(25%) (試藥特級) (日本和光純藥工業株式會社, Japan)、醋酸銨(分析級) (Sigma-Aldrich, USA)

### 三、儀器與裝置

(一)液相層析儀：包括液相層析系統(ultimate3000 UHPLC, Thermo Fisher Scientific, USA)搭配光二極體陣列檢出器(DAD-3000 Diode Array Detector, Thermo Fisher Scientific, USA)

(二)液相層析管柱：1.7  $\mu\text{m}$ ，內徑2.1 mm  $\times$  15 cm (Acquity UPLC BEH C18, Waters, USA)

### 四、標準溶液之配製

取羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅對照用標準品各約100 mg，精確稱定，分別以去離子水溶解並定容至10 mL，作為標準原液，於4 $^{\circ}\text{C}$ 避光貯存。臨用時取適量各標準原液混合，以移動相溶液A稀釋至0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，供作標準溶液。

### 五、檢液之調製

檢體經80 $^{\circ}\text{C}$ 乾燥後，以均質機磨碎，取約5 g，精確稱定，置於50 mL離心管中，加入甲醇及1.25%氨水溶液各10 mL，以2000  $\times\text{g}$  離心5分鐘，取上清液，於55 $^{\circ}\text{C}$ 下減壓濃縮至0.5 - 1 mL，殘留物加入甲醇1 mL混勻後，再加丙酮10 mL使多醣類沉澱，以2000  $\times\text{g}$ 離心5分鐘，取上清液，重複上述減壓濃縮、丙酮沉澱及離心步驟1 - 2次(視沉澱物多寡)。將上清液減壓濃縮至剛乾，殘留物以甲醇1 mL溶解，加入移動相溶液A 4 mL並移入15 mL離心管中，加入正己烷5 mL，旋渦混合1分鐘，以2000  $\times\text{g}$ 離心10分鐘，取下層液，經濾膜過濾，供作檢液。

### 六、高效液相層析儀分析條件

(一)層析管柱：Acquity UPLC BEH C18，2.1 mm  $\times$  15 cm，1.7  $\mu\text{m}$

(二)移動相組成

A液：稱取醋酸銨7.71 g，以去離子水100 mL溶解，加入乙腈25 mL，再加去

離子水使成1,000 mL，以1.25%氨水溶液調整pH值至約7.8，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液A。

B液：稱取醋酸銨7.71 g，以去離子水100 mL溶解，加入乙腈500 mL，再加去離子水使成1,000 mL，以1.25%氨水溶液調整pH值至約7.8，經濾膜過濾，取濾液供作移動相溶液B。

移動相梯度如表一

移動相流速：0.4 mL/min

注入體積：10  $\mu$ L

層析管溫度：50°C

偵測波長範圍：350 - 750 nm

表一、移動相梯度分析條件

時間(min)	A (%)	B (%)
0.0 → 2.0	100 → 90	0 → 10
2.0 → 7.0	90 → 90	10 → 10
7.0 → 11.0	90 → 54	10 → 46
11.0 → 13.0	54 → 54	46 → 46
13.0 → 14.0	54 → 53	46 → 47
14.0 → 16.0	53 → 53	47 → 47
16.0 → 22.0	53 → 10	47 → 90
22.0 → 25.0	10 → 10	90 → 90
25.0 → 25.1	10 → 100	90 → 0
25.1 → 30.0	100 → 100	0 → 0

## 七、鑑別試驗

精確量取檢液及標準溶液各10  $\mu$ L，分別注入液相層析儀中，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。

## 八、偵測極限(limit of detection, LOD)之評估

取空白檢體添加已知含量之標準溶液進行液相層析儀分析，就所得波峰之訊號強度計算其訊噪比(S/N ratio)，以訊噪比大於3之最低濃

度為偵測極限。

## 九、市售檢驗之分析

於106年4月至7月間，由市場及大賣場取得3件紅龜粿及3件麻糬檢體，以所建立之方法進行分析。

## 結果與討論

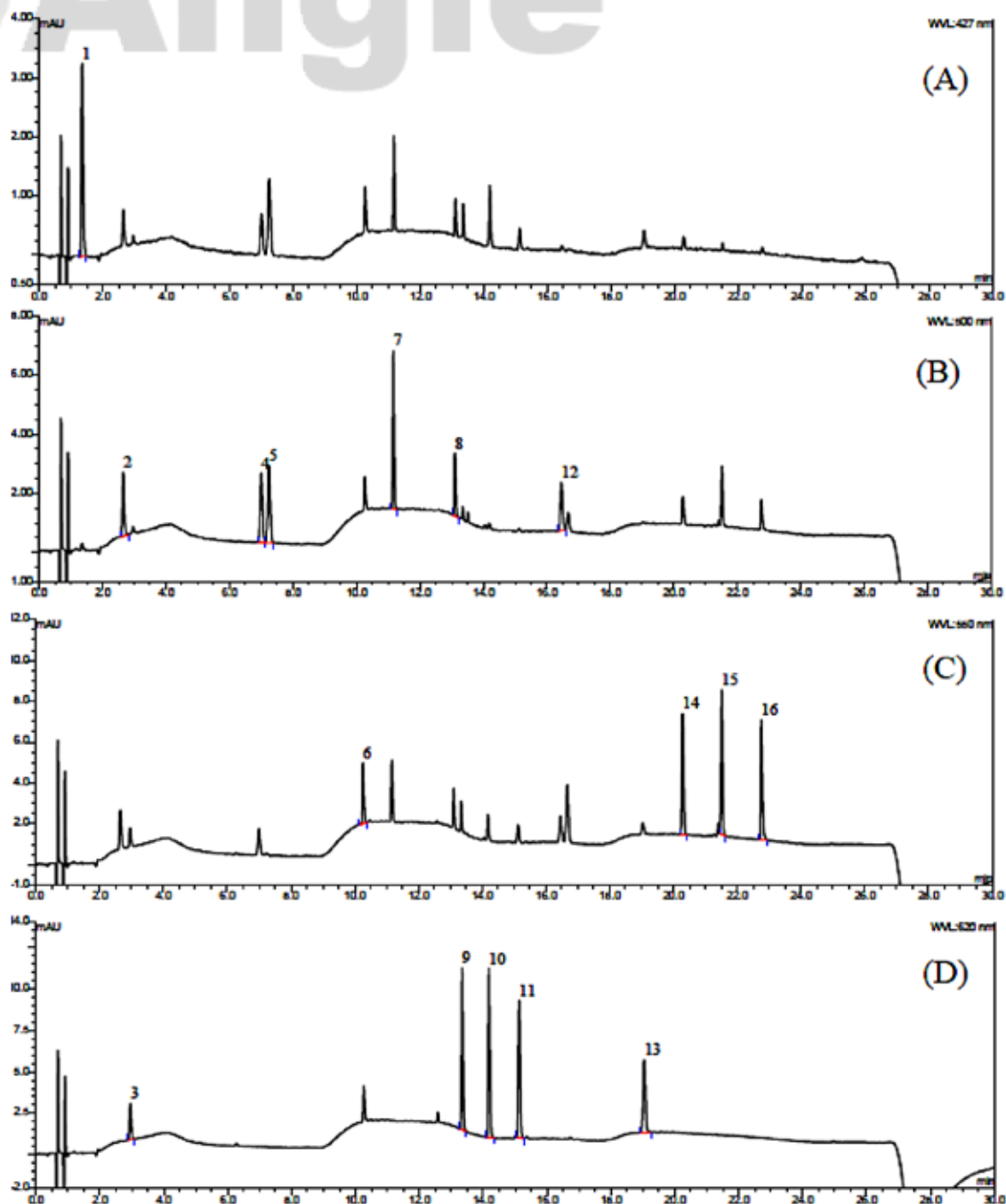
### 一、液相層析條件的選擇

本研究建立以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器分析米製品中著色劑，包括羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅4種著色劑，移動相及管柱條件參考本署公開建議檢驗方法食品中著色劑之檢驗方法(二)<sup>(11)</sup>。該方法適用於飲料與糖果中食用黃色四號等16品項著色劑之檢驗，層析圖譜及品項如圖一所示。本研究應用該方法之層析條件，使各實驗室於例行性飲料及糖果之著色劑檢驗工作，亦可進行分析米製品之著色劑檢驗。羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅4種著色劑之層析圖譜如圖二所示，顯示該層析條件具有良好的分離情形。

### 二、前處理條件之比較

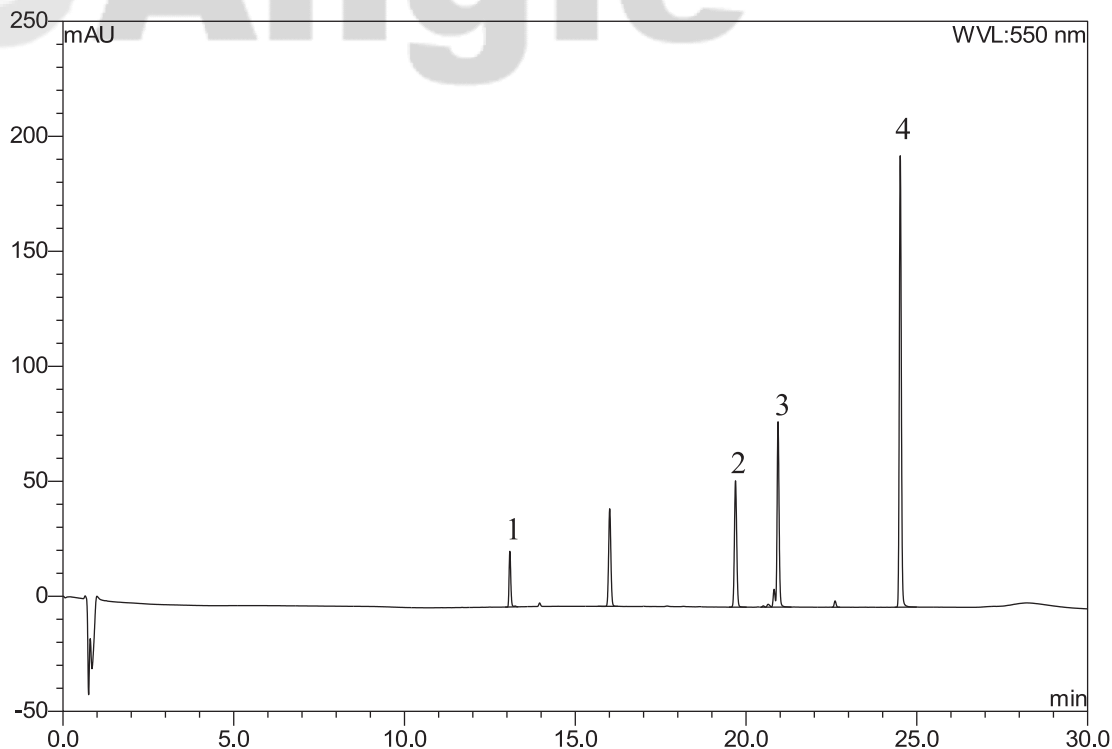
在檢驗分析前必須將檢體進行均質，以獲取代表性樣本。而本方法特別針對米製品黏性高之檢體進行前處理條件探討，如傳統食品麻糬及紅龜粿類無法以均質機進行均質，因此本研究先以液態氮使其硬化後再進行粉碎之方式進行探討，發現以液態氮處理後檢體硬化情形良好，但以研鉢研磨時並無法將之磨至粉碎狀，且硬化情形亦會隨時間而快速回溫導致黏性上升。因此本研究針對米製品長時間加熱會因老化而硬化之特性<sup>(12)</sup>，改採高溫處理，將檢體壓平後，置於80°C烘箱隔夜後，即可將檢體以均質機粉碎。

米製品中羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑鑑別方法之建立



圖一、16項著色劑於波長427 nm (A)、500 nm (B)、550 nm (C)及620 nm (D)之HPLC圖譜

1.Tartrazine ; 2. Amaranth ; 3. Indigo Carmine ; 4. New Coccin ; 5. Sunset Yellow FCF ; 6. Brilliant Black BN ; 7. Allura Red AC ; 8. Azorubine ; 9. Green S ; 10. Fast Green FCF ; 11. Brilliant Blue FCF ; 12. Erythrosine ; 13. Patent Blue V ; 14. Food Red No. 106 ; 15. Phloxine ; 16. Rose Bengal



圖二、4項著色劑之HPLC圖譜

1.偶氮玉紅(azorubine)；2.酸性紅(food red No. 106, acid red)；3.夾竹桃紅(phloxine B)；4.羅丹明B(rhodamine B)

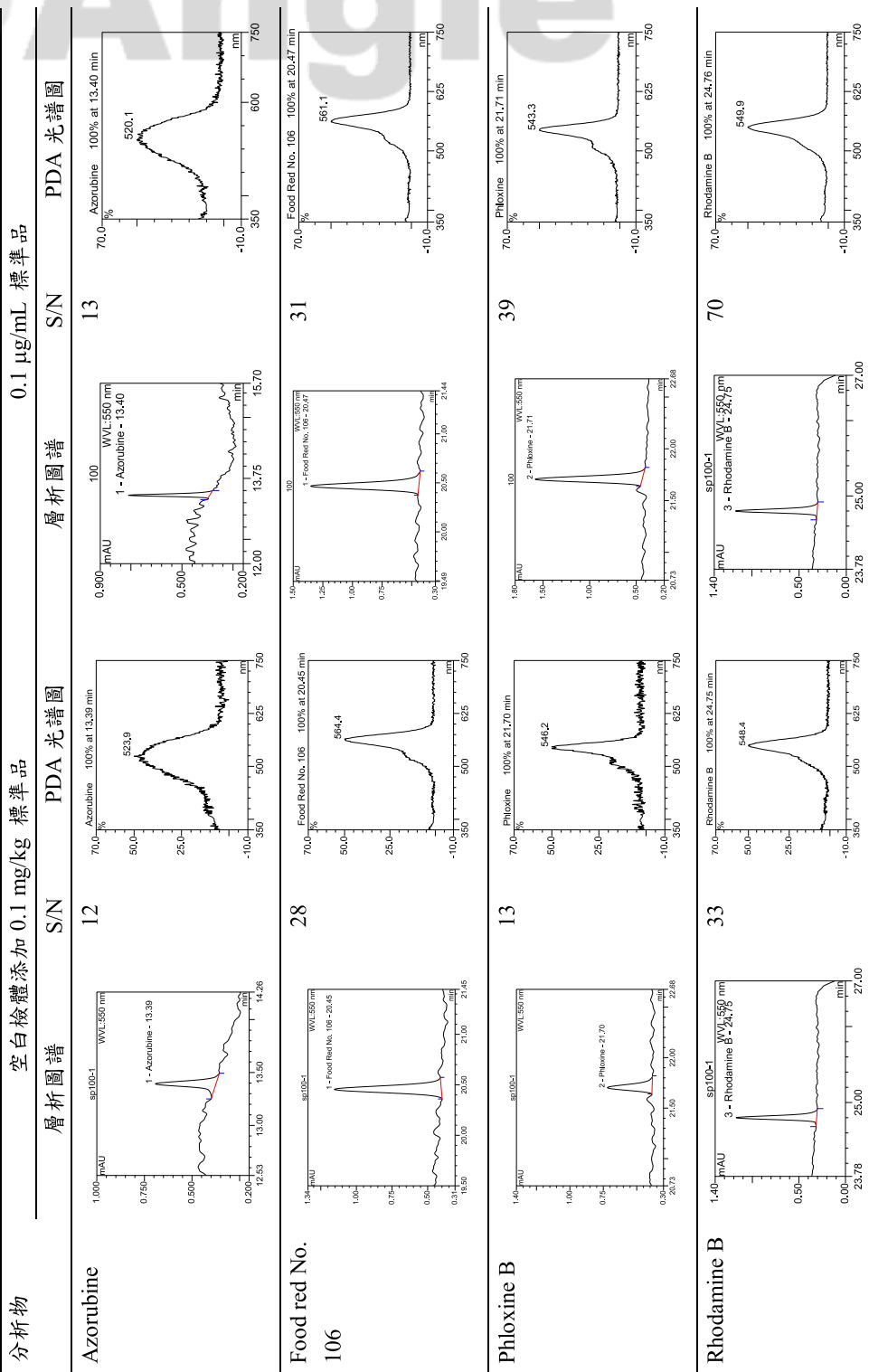
依衛生福利部102年9月6日部授食字第1021950329號公告修正之「食品中著色劑之檢驗方法」之毛線染色步驟可調製含酸性色素之檢液，但鹽基性煤焦色素如羅丹明B則不易著色於毛線上。本研究建立以甲醇及1.25%氨水溶液進行萃取，於55°C下減壓濃縮後，殘留物加入甲醇1 mL，透過丙酮作用使多醣類沉澱。因多醣類本身分子量大，所以分子間有較大吸引力，較難藉由溶劑之氫鍵將其分開，使其溶解至溶劑中，故溶解度較小。丙酮能將多醣類沉澱之原理<sup>(13)</sup>，主要是降低水溶液的介電常數，溶劑的極性與其介電常數密切相關，極性越大介電常數越大，水的介電常數約80，而丙酮的介電常數為21.4，溶液中加入丙酮能降

低溶液的介電常數，減少溶劑的極性，從而削弱了溶劑分子與多醣分子間的相互作用力，增加多醣分子間的相互作用，導致多醣類溶解度降低而沉澱。另一方面由於使用的丙酮與水互溶，在溶解的過程將多醣分子周圍的水化層奪去水分子，破壞了多醣分子的水膜，也加強了沉澱作用的反應。因此本研究以此原理建立本檢驗方法之前處理步驟。

### 三、偵測極限之評估

本研究之偵測極限為含有已知量待測物之低濃度樣品，經前處理後層析圖中待測物波峰之訊噪比(S/N ratio)大於3之最低濃度。於粉碎後之空白檢體中加入混合標準溶液，使其濃度

米製品中羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑鑑別方法之建立



圖三、空白檢體添加 0.1 mg/kg 與 0.1 µg/mL 標準品層析圖譜及光譜圖之比較

各為0.1 ppm，依上述方法進行3重複試驗，以液相層析質譜儀進行分析，其中添加0.1 ppm濃度之層析圖如圖三所示，比對4種著色劑之PDA光譜圖，當空白檢體添加0.1 ppm濃度與標準品之圖譜結果相符，可避免例行性檢驗時偽陽性之情形發生，因此本方法4種著色劑之偵測極限訂為0.1 ppm。

#### 四、市售食品樣品採樣分析

利用本方法進行市售3件紅龜粿及3件麻糬檢體規定外著色劑殘留分析，檢驗結果發現，6件檢體皆未檢出羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅4種著色劑。

### 結 論

本研究建立以高效液相層析儀搭配光二極體陣列檢出器分析米製品中羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅等4種著色劑之鑑別方法，檢體經萃取，以丙酮沉澱除去多醣基質後，改進了傳統毛線染色法操作不易染色之缺點。試驗結果，4種著色劑之偵測極限均為0.1 ppm。以本方法進行3件紅龜粿及3件麻糬檢體之羅丹明B、酸性紅、夾竹桃紅及偶氮玉紅著色劑分析，結果均為未檢出。本方法檢驗流程簡單容易、分析時間短，可應用於例行性檢驗工作，並已公開為建議檢驗方法供各界參考引用，以提升檢驗效率。

### 參考文獻

1. 盧士英、鄒明強。2009。食品中常見的非食用色素的危害與檢測。中國儀器儀表，8: 45-50。
2. International Agency for Research on Cancer(IARC). 1978. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. [<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol1-42/mono16.pdf>].
3. World Health Organization(WHO).1983.Evaluation of certain food additives and contaminants. [[http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_696.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_696.pdf)].
4. U.S. Government Publishing office. 2018. Electronic code of Federal Regulations Title 21 Part 74.1328. [<https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/CFR-2009-title21-vol1/pdf/CFR-2009-title21-vol1-sec74-1328.pdf>].
5. Harp, B.P., Miranda-Bermudez, E. and Barrows, J.N. 2013. Determination of seven certified color additives in food products using liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 61: 3726-3736.
6. Martin, F., Oberson, J., Meschiari, M. and Munari, C. 2016. Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC-MS in selected matrices. Food Chem. 197: 1249-1255.
7. Dixit, S., Khanna, S.K. and Das, M. 2011. A simple method for simultaneous determination of basic dyes encountered in food preparations by reversed-phase HPLC. J. AOAC Int. 94(6): 1874-1881.
8. Daood, H.G. and Biacs, P.A. 2005. Simultaneous determination of Sudan dyes and carotenoids in red pepper and tomato products by HPLC. J. Chromatogr. Sci. 43: 461-465.
9. Wang, C.X., Fang, H.L., Li, X.M. and *et al.* 2008. Determination of rhodamine B in food by high performance liquid chromatography-fluorescence detection. Anal. Inst. 1: 27-30.
10. Chiang, T.L., Wang, Y.C. and Ding, W.H. 2011. Trace determination of rhodamine B and rhodamine 6G dyes in aqueous samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. J. Chin. Chem. Soc. 59(4):

- 515-519.
11. 食品藥物管理署。2017。食品中著色劑之檢驗方法(二)。公開建議檢驗方法。106.01.06公開之建議檢驗方法。[<https://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?mid=133&id=22388&t=s>]。
12. 賴喜美。2014。米食多元化加工技術-米穀粉之研究與開發。農業生技產業季刊，39: 56-62。
13. 余冰賓。2004。生物化學實驗指導。35頁，清華大學出版社有限公司，北京。

## Determination of Colorants (Rhodamine B, Food Red No. 106, Phloxine B, and Azorubine) in Rice Products by High Performance Liquid Chromatography

CHING-HAO KUO, MING-CHIH FANG, CHIA-FEN TSAI, YA-MIN KAO,  
DER-YUAN WANG AND HWEI-FANG CHENG

Division of Research and Analysis, TFDA

### ABSTRACT

Food colorings are usually added to offset the color loss during food processing, as well as to make its appearance more attractive to consumers. The official method promulgated by TFDA for the analysis of dyes in food involves a simple pretreatment step called “wool dyeing” to selectively absorb acid dyes for the purpose of clean up and pre-concentration. However, this method is not suitable for the analysis of basic dyes. Therefore, this study was aimed at developing an appropriate sample preparation method for basic dyes, including rhodamine B, food red No. 106, phloxine B, and azorubine in rice products. Acetone was applied to precipitate polysaccharides in rice-cake extract to clean up food matrix instead of wool dyeing. High performance liquid chromatograph coupled with photodiode array detector was employed to determine four illegal dyes. The limit of detection (LOD) of this method was estimated to be 0.1 ppm. Six rice cake products purchased from local markets were surveyed for the contents of 4 illegal dyes. The results showed all samples were negative.

Key words: processed rice product, rhodamine B, dye, HPLC