

東海大學食品科學系碩士班

Master of Food Science

Tunghai University

食品科技組

Food Technology Section

開發電化學方法應用於食品中

日落黃、檸檬黃之定量檢測

**Development of an electrochemical method for quantitative
determination of sunset yellow and tartrazine in foods**

賴鵬年

Peng-Nien Lai

指導教授：徐詮亮 博士

Advisor: Chuan-Liang Hsu, Ph.D.

中華民國一百零五年四月

Apr, 2016

碩士論文指導教授推薦書

食品科學系碩士班食品科技組 賴鵬年 君所提之論文

開發電化學方法應用於食品中

日落黃、檸檬黃之定量檢測

Development of an electrochemical method for
quantitative determination of sunset yellow and
tartrazine in foods

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學系系主任



指導教授



中華民國一零五年五月十日

碩士論文考試委員審定書

食品科學研究所科技組 賴鵬年 君所提之論文

開發電化學方法應用於食品中

日落黃、檸檬黃之定量檢測

Development of an electrochemical method for
quantitative determination of sunset yellow and
tartrazine in foods

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

張名昌

元培醫事科技大學食品科學系教授

趙中平

國立勤益科技大學化工與材料工程系助理教授

莊良傑

東海大學化學系助理教授

指導教授：孫詒長

中華民國一零五年四月七日

謝誌

在研究所學習的日子裡，很幸運的受到許多人的幫助，需要感謝的人太多了。首先誠摯感謝指導教授 徐詮亮博士，求學期間悉心指導、傾囊相授，並在論文撰寫期間，不厭其煩的審閱並給予許多寶貴意見，使論文更臻至完善。論文初成時，感謝元培醫事科技大學食品科學系 張谷昇博士、國立勤益科技大學化工與材料工程系 黃怡銘博士及東海大學化學系 莊旻傑博士撥冗審閱論文及參與口試，對論文給予斧正和指導，使論文更為嚴謹。

在學期間，謝謝實驗室裡所有夥伴給我的關懷以及鼓勵。謝謝寬、中愷學長及昭蓁、昱華學姐的照顧與教導，讓我能夠快速的進入軌道；謝謝松佑、性樺學弟、惟智學弟、欣瑜學妹的幫忙以及鼓勵，謝謝專題生倩妤、芸禎、宜均學妹的扶持與鼓勵。有你們讓我的研究生生活更多采多姿。另外還要特別感謝同窗柏凱在 HPLC 上的幫助，以及化學系美麗的佩姻在 FTIR 方面幫助及包容，使我得以順利完成實驗。

此外，感謝好友博仁、上嘉、大雄、彥明，謝謝你們在我迷惘無助的時候，陪伴我、幫我打氣；在我受挫的時候，耐心傾聽我的抱怨，並給予我繼續堅持下去的信心來面對挑戰。最後，我要感謝我的家人，在學兩年多的時間不斷關心研究進度和身體健康狀況，並提供我的日常生活開銷，讓我在求學過程無後顧之憂，謝謝你們，謹將這份榮耀與你們分享。

賴鵬年 謹致於
東海大學食品科學系碩士班
中華民國一〇五年四月

摘要

日落黃(sunset yellow)、檸檬黃(tartrazine)為食品的著色劑，其使用成本以及穩定性都較天然著色劑良好，在加工食品中的使用頻率很高，因為可以在大量生產中穩定品質，故在加工食品中扮演很重要的角色。但食用過量可能會造成過動、智力衰退、甚至可能會影響到生物的生殖系統，最嚴重可能會導致不孕，已成為影響健康的一大隱憂。傳統的檢測方式以高效液相層析法為主，但是其成本高、耗時、技術性高，故本研究主要以電化學方法開發一套快速的檢測方法，此檢測系統選擇的工作電極為網版印刷電極(screen-printed carbon electrode, SPCE)，並選擇氧氣電漿(oxygen plasma)作為修飾電極的方法，利用循環伏安法(cyclic voltammetry, CV)掃描，找出最適實驗條件，進一步製作出日落黃濃度對電流訊號的標準曲線，並應用於實際樣本檢測中。本研究的檢測結果分為兩個部分，氧氣電漿修飾 SPCE 電極的部分:修飾時間為 60 分鐘、電壓 21kV、電極間距 0.5 公分、氣體流量為 500 (cc/min)；電化學掃描的部分:使用的緩衝溶液濃度 0.1 M、45°C、pH=4 的磷酸緩衝溶液(PBS)，掃描速率為 100 mV/s，此系統的標準曲線日落黃為 $y = 0.0037x + 0.3479$ ，偵測極限為 12.2 ppm，決定係數(r^2)為 0.9988；檸檬黃為 $y = 0.003x + 0.4640$ ，偵測極限為 34.1 ppm，決定係數(r^2)為 0.9955。實際樣品檢測的回收率為 55.2% ~ 123.3%。代表在上述條件下所建立的系統適合應用於日落黃及檸檬黃定量檢測。

【關鍵詞】日落黃、檸檬黃、循環伏安法、氧氣電漿表面修飾、網版印刷電極

Abstract

Sunset yellow (SY) and tartrazine (TT) are legal synthetic colourants that have been widely used in foods due to its low cost, high effectiveness and excellent stability. However, excessive addition of sunset yellow or tartrazine in foods may be harmful to human beings. Hence, monitoring the concentration of SY and TT in foods is very important. In this study, a screen-printed carbon electrode (SPCE) that modified with atmospheric non-thermal dielectric barrier discharge (DBD) plasma was fabricated and used for the quantitative determination of SY and TT. The process parameters of plasma treatment were frequency at 60 Hz, input power at 21 kV, exposure time for 60 mins, electrode spacing for 0.5 cm, and using oxygen as working gas (500 sccm). Through cyclic voltammetry (CV), the operating conditions of this sensor: pH range were tested from pH 2 to pH 10, PBS buffer as electrolyte, the temperature was tested from 25 °C to 55 °C, and the scan rate of CV was from 10 mV/s to 400 mV/s. The optimum detecting conditions were pH 4 in PBS buffer at 45 °C and scan rate was 0.1 V/s. The calibration curve of the sensor was $y = 0.0037x + 0.3479$ for SY and $y = 0.003x + 0.4640$ for TT with correlation coefficient of 0.9988 and 0.9955, the detection limit was 12.2 ppm and 34.1 ppm. The recovery of the sensor was between 55.2% and 123.3%. The proposed electrochemical method could both rapidly and sensitivity determine the concentration of SY and TT in foods.

【Keywords】 sunset yellow, tartrazine, cyclic voltammetry, oxygen plasma surface modification

目錄

摘要.....	I
Abstract.....	II
目錄.....	III
圖目錄.....	VIII
表目錄.....	XII
第一章、緒言.....	1
1.1 研究背景.....	1
1.2 研究目的.....	3
第二章、文獻回顧.....	4
2.1 食品著色劑.....	4
2.1.1 種類與特性.....	4
2.1.2 人工食品著色劑特性及其法規限量標準.....	11
2.1.3 傳統檢測方法.....	17
2.2 電化學感測器.....	20
2.2.1 感測器原理及特性.....	20

2.2.2 電化學分析法.....	26
2.2.3 電化學電極種類與特性.....	35
2.2.4 電化學電極改質方法.....	37
2.3 電漿	42
2.3.1 電漿型態.....	42
2.3.2 電漿生成原理.....	43
2.3.3 氧氣電漿修飾電化學電極之作用與機制	44
2.4 電化學分析法於檢測食品著色劑之應用.....	49
第三章、材料與方法	64
3.1 實驗樣品.....	64
3.2 實驗試藥	64
3.3 儀器設備	66
3.4 實驗架構.....	69
3.5 電化學檢測實驗方法.....	71
3.6 氧氣電漿修飾網版印刷電極之方法.....	73

3.7 氧氣電漿修飾網版印刷電極之最適條件探討	75
3.7.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極效應探討	75
3.7.2 氧氣電漿修飾網版印刷電極之功率探討	75
3.7.3 氧氣電漿修飾網版印刷電極之修飾時間探討	76
3.7.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極之電極間距探討	76
3.7.5 氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討	76
3.8 電化學系統緩衝溶液對食品著色劑檢測影響之探討	77
3.8.1 電化學系統檢測食品著色劑之最適 pH 值探討	80
3.8.2 電化學系統檢測食品著色劑之反應槽溶液最適溫度探討	80
3.8.3 電化學系統檢測食品著色劑之最適掃描速率探討	81
3.9 電化學系統檢測食品著色劑之標準曲線	82
3.10 電化學系統及 HPLC 檢測實際樣品	82
第四章、結果與討論	84
4.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極之最適條件探討	84
4.1.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極效應探討	84

4.1.2 氧氣電漿修飾網版印刷電極之功率探討	88
4.1.3 氧氣電漿修飾網版印刷電極之修飾時間探討	91
4.1.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極之電極間距探討	94
4.1.5 氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討	97
4.2 電化學系統緩衝溶液對食品著色劑檢測影響之探討	99
4.2.1 電化學系統檢測食品著色劑之最適 PH 值探討	103
4.2.2 電化學系統檢測食品著色劑之反應槽溶液最適溫度探討	106
4.2.3 電化學系統檢測食品著色劑之最適掃描速率探討	109
4.2.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極穩定度探討	115
4.3 電化學系統檢測食品著色劑之標準曲線	118
4.4 電化學及 HPLC 檢測實際樣品之結果比較	122
第五章、結論與檢討	129
參考文獻	131
附錄一、日落黃特性	143
附錄二、檸檬黃特性	149

附錄三、食品著色劑檢驗方法.....	152
附錄四、台灣之食品著色劑使用範圍及限量暨規格標準.....	159
附錄五、中國大陸之日落黃使用範圍及限量暨規格標準.....	169
附錄六、中國大陸之檸檬黃使用範圍及限量暨規格標準.....	171
附錄七、美國之食品著色劑建議 ADI 標準值.....	172
附錄八、樣品回收率計算.....	173



圖目錄

圖 2-1、日落黃結構式	13
圖 2-2、檸檬黃結構式	16
圖 2-3、感測器原理示意圖	21
圖 2-4、電化學三電極系統意圖	28
圖 2-5、電化學分析法大綱	31
圖 2-6、檢測 A 溶液之電極表面之能階圖	32
圖 2-7、循環伏安法電位變化對應時間變化關係	33
圖 2-8、循環伏安法電位變化對應電流變化關係	34
圖 2-9、電漿表面處理的反應機構示意圖	48
圖 2-10、電化學檢測日落黃之反應機制	51
圖 2-11、azo colorants 在 BDD 電極表面還原反應機制圖	54
圖 2-12、 β -CD -PDDA-Gr 合成示意圖	57
圖 2-13、日落黃、檸檬黃在 β -CD -PDDA-Gr 修飾玻璃碳電極表面氧化、還原示意圖	58

圖 2-14、檸檬黃與日落黃之氧化還原反應機制.....	61
圖 3-1、本研究之實驗架構.....	70
圖 3-2、電化學檢測系統示意圖.....	72
圖 3-3 電漿設備系統示意圖.....	74
圖 4-1、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測日落黃之效應探討.....	86
圖 4-2、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測檸檬黃之效應探討.....	87
圖 4-3、氧氣電漿修飾網版印刷電極對檢測日落黃電流訊號之電壓探 討.....	89
圖 4-4、氧氣電漿修飾網版印刷電極之電壓探討.....	90
圖 4-5、氧氣電漿修飾網版印刷電極修飾時間對檢測日落黃電流訊號 反應之影響.....	92
圖 4-6、氧氣電漿修飾網版印刷電極修飾時間對檢測檸檬黃電流訊號 反應之影響.....	93
圖 4-7、氧氣電漿修飾網版印刷電極過程中電極間距探討圖對日落黃 檢測之影響.....	95

圖 4-8、氧氣電漿修飾網版印刷電極過程中電極間距探討圖對檸檬黃 檢測之影響.....	96
圖 4-9、氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討.....	98
圖 4-10、電化學系統之反應槽溶液對日落黃檢測影響探討.....	101
圖 4-11、電化學系統之反應槽溶液對檸檬黃檢測影響探討.....	102
圖 4-12、電化學系統磷酸鹽緩衝溶液 pH 值對日落黃檢測之影響	104
圖 4-13、電化學系統磷酸鹽緩衝溶液 pH 值對檸檬黃檢測之影響	105
圖 4-14、電化學系統溫度對日落黃檢測之影響.....	107
圖 4-15、電化學系統溫度對檸檬黃檢測之影響.....	108
圖 4-16、電化學系統掃描速率對檢測日落黃影響之探討.....	111
圖 4-17、電化學系統掃描速率對檢測檸檬黃影響之探討.....	112
圖 4-18、日落黃掃描速率的平方根對電流值之關係圖.....	113
圖 4-19、檸檬黃掃描速率的平方根對電流值之關係圖.....	114
圖 4-20、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測日落黃穩定度探討..	116
圖 4-21、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測檸檬黃穩定度探討..	117
圖 4-22、電化學系統檢測日落黃之標準曲線.....	120

圖 4-23、電化學系統檢測檸檬黃之標準曲線..... 121



表目錄

表 2-1、焦煤色素種類.....	6
表 2-2、食用煤塔色素性質表.....	7
表 2-3、食用著色劑與各主要國家的著色劑名稱對照表	8
表 2-4、常見合成材料表面處理方法.....	47
表 2-5、電化學分析法於檢測食品著色劑之應用	63
表 3-1、Britton-Robinson 緩衝溶液配方	78
表 3-2、acetate 緩衝溶液配方	79
表 4-1、以電化學法與高效液相層析法檢測食品中日落黃及檸檬黃	127
表 4-2、電化學與 HPLC 檢測方式比較	128

第一章、緒言

1.1 研究背景

著色劑是常見的食品的添加物。目前台灣法規核可的項目有 39 項。日落黃(Sunset yellow, SY)、檸檬黃(Tartrazine, TT) 為常添加在乳製品、零食、穀類、烘焙製品、點心製品、飲料、藥品、化妝品中作為著色劑。目前各國都有針對這些添加物有所規範，台灣目前只針對焦糖色素訂定出明確的使用規範，其餘的項目只有規定於生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等產品當中不得添加，其餘食品中可以視實際情況添加。歐盟針對不同的食品有嚴謹的使用規範，在湯類單獨或合併使用不得超過 50 ppm；在氣泡類飲料、果凍、果醬、煙燻鮭魚不得超過 100 ppm；糕餅類、芥末醬、魚卵不得超過 300 ppm；醬料、調味料則不得超過 500 ppm。美國 FDA 公布的日落黃、檸檬黃每日容許攝取量(Acceptable daily intake, ADI)為 5 mg/kg bw/day、3.75 mg/kg bw/day(附錄七)。中國大陸的法規針對不同種類的加工產品有十分完整的資訊，如附錄五、附錄六。世界衛生組織建議每日容許攝取量為 0~2.5 mg/kg。

日落黃、檸檬黃食用過量可能會導致過敏(Nevado *et al.*, 1997)、過動(Silva *et al.*, 2007)、免疫下降(Skinner and Fowler, 1995)等症狀，因此有檢測其含量的必要性。現階段常用於檢測食品中食用著色劑的方法有濾紙層析法、分光光度法、高效液相層析法等等。國內依照衛生福利部於 101 年公布衛署食字第 1011903531 號「食品著色劑檢驗方法」，採用毛線染色後，利用濾紙層析(paper chromatograph, PC)、薄層層析(thin layer chromatograph, TLC)以及高效液相層析法(high performance liquid chromatograph, HPLC)，然而這些檢測方法所需要的時間

以及成本高，包含了昂貴的儀器設備，複雜的操作以及處理步驟，往往從檢驗開始到報告出來的過程當中，食品已經進入消費者腹中，因此開發快速、低成本、操作方便的檢測技術，對食品產業與衛生機關及消費者而言實在是刻不容緩。故在此以電化學技術開發一套快速、可以直接檢測食品中著色劑的方法。



1.2 研究目的

人工食品著色劑的使用從過去到現在一直飽受爭議，因為有越來越多文獻指出過量食用人工食品著色劑對於健康有傷害，雖然在符合規範的情況之下不會對人體有立即性的傷害，但是民眾會對於未知的致癌添加物會產生恐懼，更可能進一步造成社會資源的浪費。以傳統方法 HPLC 檢測雖然準確，但十分耗時，且成本高，一般民眾沒有能力負擔，容易在食安事件爆發時造成民眾恐慌，基於以上的考量傳統的檢測方式有改善的空間。

本研究主旨為：

1. 利用電化學系統開發快速、低成本方法應用於食品中日落黃以及檸檬黃定量檢測。可以做為樣品在生產線上初步門檻篩選的工具。
2. 評估氧氣電漿修飾網版印刷電極之參數，包含電極間距、功率以及修飾時間，建立一組最合適用在檢測食品著色劑日落黃、檸檬黃之氧氣電漿修飾網版印刷電極。
3. 藉由循環伏安法找出系統最佳的檢測條件與參數，包含檢測的溫度、緩衝溶液、pH 值、循環伏安法掃描速率，利用最適條件建立屬於日落黃、檸檬黃濃度對電流訊號差的標準曲線，並將標準曲線應用在食品樣品檢測中，達到快速篩選的目的。

第二章、文獻回顧

2.1 食品著色劑

2.1.1 種類與特性

食品的顏色對於人主觀的感受影響十分顯著，尤其是尚未嘗試過的食物，其外觀以及色澤往往是影響第一印象很重要的因素。好吃的食物往往需要兼具色、香、味三個要素。然而食品在加工的過程當中，常常會經過加熱烹調、光照等處理，食材又暴露在空氣中，這些處理步驟可能會影響到食品的外觀、顏色，造成消費者誤以為產品變質或者不好吃，這樣會直接影響到產品的銷售。

為了讓產品在加工完成之後可以保持原本的顏色，著色劑的使用十分重要。著色劑一般常見於加工食品中，像是飲料、餅乾、糖果、冰淇淋、果凍、汽水、蜜餞、肉乾等。

食用著色劑依照化學結構可以區分為發色團(chromophoric)和助色團(auxochromes)結構，發色團通常含有多個 $-C=C-$ 、 $-C=O$ 、 $-N=N-$ 、 $-N=O$ 或 $-C=S$ 等含雜原子的雙鍵構成的共軛系統。助色團為使染料顯出顏色的基團，通常含有 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-SO_3H$ 等基團。不同著色劑的顏色差異和著色劑的變色與發色團和助色團的結構和變化有關。依據結構不同，著色劑可分為五類(許與陳，2014)：

1. 四吡咯(pyrrole)衍生物(或卟啉 porphyrins 衍生物)：葉綠素和血紅素。
2. 異戊二烯衍生物(isoprenoids)：類胡蘿蔔素。
3. 多酚類衍生物：花青素、花黃素等。

4. 酮類衍生物：紅麴色素、薑黃素等。

5. 琨類衍生物：蟲膠 (shellac) 色素、胭脂紅 (carmine) 等。

常見的著色劑主要有兩種，分別是天然著色劑以及人工合成著色劑。通在人工著色劑開發以前，主要的著色劑來自於動物、植物以及微生物，目前已開發的天然著色劑有一百多種(蕭，2014)，主要包含：花青素、類胡蘿蔔素、葉綠素、類黃酮素、紅麴色素、薑黃素等。雖然使用天然著色劑進行著色具有較高的安全性，但是其成本較高、品質易受到外在環境因素包括溫度、pH、光照、氧氣的影響而變質、不易混和均勻、不易著色等特性，並不是很理想的著色劑。

1856年英國 W. H. Perkins 利用乙醇溶解苯胺與二鉻酸鉀氧化後得到黑色沉澱物，得到了第一個人工合成著色劑苯胺紫(mauveine)，從此之後許多和成的著色劑陸續被開發出來，應用在工業、紡織業、印刷業、食品加工業中。現在常用的人工食品著色劑主要是煤炭經乾餾得到的煤焦色素(coal tar colors)，這些著色劑可以分成四種，如表 2-1 所示，這些著色劑的性質如表 2-2 所示。人工著色劑包含了確認色素(certified colors)以及新合成色素(uncertified colors)兩種。確認色素不存在於天然物中，為人工合成的著色劑，目前衛生福利部公布的包含紅色六號、紅色七號、紅色四十號、黃色四號、黃色五號、綠色三號、藍色一號以及藍色二號等。這些著色劑可以區分為染料(dye)以及麗基(lake)兩類，其中染料為水溶性的，麗基是染料與鋁或鈣等離子反應後生成的鹽類，並利用礬土吸附，屬於非水溶性著色劑，可以依照需求選擇水溶性或者非水溶性的著色劑。新合成色素是人工方式和成的天然著色劑，又稱為天然同等物(nature identical)，包含許多類胡蘿蔔素、修飾花青素(modified anthocyanin)等。目前國內核准使用在食品中的確認人工著色劑一共有八種，其命名與國際命名對照如表 2-3。

表 2-1、焦煤色素種類(劉，2010)。

Table 2-1 Different types of coal tar colors.

分類	品項	鋁麗基
偶氮系統色素 (azo color)	食用紅色六號 (cochineal)	
	食用黃色四號 (tartrazine)	V
	食用黃色五號 (sunset yellow)	V
二苯并派喃系統色素 (xanthene color)	食用紅色七號 (erythrosine)	V
三苯甲烷系統 (triphenylmethane color)	食用綠色三號 (fast green)	V
	食用藍色一號 (brilliant blue)	V
靛系統色素 (indigold color)	食用藍色二號 (indigo carmine)	V

打 V 代表有鋁麗基的著色劑

表 2-2、食用煤塔色素性質表(劉，2010)。

Table 2-2 Properties table of coal tar colors.

色素名稱	耐熱	耐日光	耐鐵	耐酸	耐鹼	微生物	耐氧化	耐還原 A	耐還原 B	染著力	食鹽	各種溶劑之溶解度 (g/100g)							
												蒸餾水				10%食鹽水	20%食鹽水	丙二醇	酒精
												0℃	15℃	30℃	60℃	30℃	30℃	30℃	30℃
食用紅色 6 號 (cochineal red)	2	2	1	3	1	1	2	1	1	2	3	18.8	23.5	37	53.2	8.3	0.07	6.7	微溶
食用紅色 7 號 (erythrosine)	4	1	3	0	2	3	4	4		4	3	8.3	9.8	13	17.8	0.02	微溶	37	1.9
食用黃色 4 號 (tartrazine)	3	2	2	4	3	3	1	3	4	2	4	3.4	12.5	36	48	4.2	0.04	11	微溶
食用黃色 5 號 (sunset yellow)	3	2	2	4	3	3	1	0	3	2	3	8.7	19.8	25	29	0.42	微溶	2.8	微溶
食用藍色 1 號 (brilliant blue FCF)	4	4	3	4	3	4	3	3	3	2	4	25.3	64	68	70	39	38	18.7	3.0
食用藍色 2 號 (indigo carmine)	1	1	4	2	2	1	0	2	1	3	0	0.67	0.8	1	2	微溶	0	0.1	微溶
食用綠色 3 號 (fast green FCF)	2	2	2	2	1	3	3	0	3	3	3	可溶	-	-	-	-	-	-	微溶

記號：4 (非常安定)、3 (安定)、2 (稍安定)、1 (稍不安定)、0 (很不安定)

耐還原 (A)：係 0.5% 之次亞硫酸鈉溶液 (還原漂白劑)

耐還原 (B)：係維生素 C 0.1% 水溶液

表 2-3、食用著色劑與各主要國家的著色劑名稱對照表(姜，2014)。

Table 2-3 The name of food colorants in different nations.

	台灣	CI	英文名	日本	歐盟
	食用紅色六號	16255	Cochineal Red A	赤色 102 號	E124
	食用紅色七號	45430	Erythrosine	赤色 3 號	E127
	食用紅色四十號	16035	Allura Red AC	赤色 40 號	E129
	食用黃色四號	19140	Tartrazine	黃色 4 號	E102
	食用黃色五號	15985	Sunset Yellow	黃色 5 號	E110
	食用綠色三號	42053	Fast Green FCF	綠色 3 號	E143
	食用藍色一號	42090	Brilliant Blue FCF	青色 1 號	E133
	食用藍色二號	73015	Indigo Carmine	青色 2 號	E132



相對地人工著色劑顏色多變鮮豔、穩定性高，不易受到環境影響、成本低、著色能力強等特性。所以人工合成的食品著色劑大量的被應用在加工食品中。

但是不同於天然著色劑，人工合成著色劑大多對於人體健康沒有幫助，有些甚至會對健康造成負面的影響。不同的人工著色劑皆有不同程度的毒性，尤其是工業用的著色劑。目前已禁止使用在食品中的素著色劑包含了蘇丹紅、油融黃、奶油黃等等，蘇丹紅在 1918 年曾經被美國批准做為食品添加劑，後來發現蘇丹紅 I 號會導致老鼠、兔子等動物罹癌，也能進一步造成人體肝臟細胞 DNA 突變，故歐盟早在 1995 年立法限制(歐盟執委會第 95/45/EC 號指令)包含蘇丹紅 I 號等部分人工著色劑添加在食品中(馬，2012)。

關於現階段批准添加在食品中的人工著色劑，近年來有越來越多不同的聲音。有越來越多的文獻指出過量服用可能會影響健康。2007 年，英國學者 McCann D 研究發現幼童飲用含有人工食用著色劑素包括黃色 4 號、5 號及紅色 6 號、40 號的飲料之後，出現了過動以及注意力不集中的情形，而且在一個星期的時間就可能影響學習，甚至造成學習障礙(McCann *et al.*, 2007)。

其他症狀包含了過敏(Nevado *et al.*, 1997)、過動(Silva *et al.*, 2007)、免疫下降(Yadav *et al.*, 2013)等症狀。近年來隨著健康意識抬頭，越來越多人開始關注到食品添加物可能對健康造成的風險。因此 2010 年 7 月歐盟針對其成員國出口的食品新增一條規定，如食品內含有檸檬黃、日落黃、胭脂紅等六種人工合成著色劑，必須在產品標示“可能對兒童的行為或專注力有不良影響的字樣”(馬，2012)，表示人工著色劑對人體健康的影響不容忽視，要從平時的飲食習慣中多注意，避免攝入過多的人工著色劑而不自知。

本研究選擇日落黃以及檸檬黃兩種食品著色劑進行研究，這兩種著色劑皆屬於偶氮類，而現階段使用中的人工合成著色劑中高達65%為偶氮類著色劑(Ahlström *et al.*, 2005)，著實為相當高的比例，再加上這些含有偶氮類著色劑加工食品在市面上流通率高，對於一般民眾的影響也較深，故本研究從焦煤色素中的偶氮系統選擇了日落黃以及檸檬作為研究的對象。



2.1.2 人工食品著色劑特性及其法規限量標準

(1) 日落黃(sunset yellow, SY)

日落黃，又名橙黃，在台灣的法規中訂為黃色五號，英文 sunset yellow，縮寫 SY，分子式為 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ ，相對分子量為 452.38g/mol，屬於偶氮類著色劑。結構式如圖 2-1。特性(附錄一)，日落黃為橙紅色粉末或顆粒，無臭。易溶於水、甘油、丙二醇，微溶於乙醇，在 25°C 時的溶解度為：19.0%(水)，3.0%(50%乙醇)，20%(50%甘油)，7.0%(50%丙二醇)。不溶於油脂，中性和酸性水溶液呈橙黃色，遇鹼變為紅褐色(周等，2008)。

台灣對於 SY 限量標準係依據衛生福利部食品藥物管理署法規屬於第(九)類著色劑，著色劑之使用範圍及限量如附錄四所示，SY 的添加限量規範為：本品可於各類食品中視實際需要適量使用。但是不得使用於生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等產品當中。

關於偶氮類著色劑爭議不斷，2005 年市面上有 65% 合成著色劑為偶氮類素色(Ahlström *et al.*, 2005)，近年來也有一些新的發現，可能有基因毒性以及致癌風險(Balakrishnan *et al.*, 2016)。各國對於此類著色劑使用上的規範不盡相同。World Health Organization (WHO) 建議 SY 之每日容許攝取量(Acceptable daily intake, ADI)為 0~2.5 mg/kg，歐盟則規定 SY 的 ADI 為 0~4 mg/kg。中國大陸針對不同的食品訂出了一系列的標準如附錄五所示，大致上分為：

1. 用於果汁飲料、糕點上彩裝、碳酸飲料、糖果、西瓜醬罐頭配製酒、青梅、乳酸菌飲料、植物蛋白飲料、蝦(味)片時，最大允許使用量為 100 mg/kg。

2. 用於糖果糖衣的最大使用量為 200 mg/kg。
3. 用於風味優酪乳、風味煉乳、超高溫風味奶，最大允許使用量為 50 mg/kg。
4. 用於雪糕、冰棒、霜淇淋，最大使用量為 90 mg/kg；用於固體飲料、膨化食品、油炸小食品、餅乾夾心、話李、話杏等食品時，最大允許使用量為 100 mg/kg。
5. 用於果醬、水果調味糖漿、蛋黃醬、沙拉醬，最大允許使用量為 500 mg/kg。
6. 用於固體複合調味料、固體方便湯料，最大允許使用量為 300 mg/kg。
7. 用於果凍，最大使用量為 25 mg/kg。

此外，在食品生產加工過程中使用的日落黃的品質應達到相關標準。按照規定，牛肉、醬滷肉、魚乾等熟肉製品禁止添加日落黃。其他部分歐洲國家如芬蘭、挪威則禁止日落黃使用於食品中。

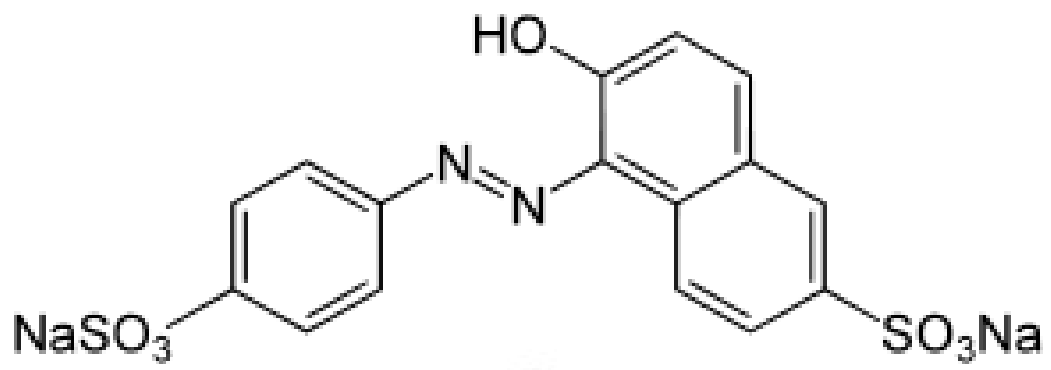


圖 2-1、日落黃結構式。

Fig. 2-1 The molecular structure of sunset yellow (SY).



(2) 檸檬黃(tartrazine, TT)

檸檬黃，英文 tartrazine，縮寫 TT，分子式為 $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$ ，結構式如圖 2-2。特性(附錄二)為橙黃色的無臭顆粒或粉末，易溶於水、甘油、丙二醇，微溶於乙醇，不溶於油脂。溶於水呈黃色，其水溶液遇硝酸、硫酸、鹽酸和氫氧化鈉仍呈黃色，遇鹼微變紅。水溶液的最大吸光值在 427 ± 2 nm (Jain *et al.*, 2003)。

TT 依據衛生福利部食品藥物管理署法規屬於第(九)類著色劑，著色劑之使用範圍及限量如附錄四所示，TT 的添加限量規範與日落黃相同一樣，不得使用於生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等產品當中，其餘食品中可以視實際需要適量使用。

World Health Organization (WHO)與 EU Scientific Committee for Food (SCF)建議 TT 之每日容許攝取量(Acceptable daily intake, ADI)為 0~7.5 mg/kg，中國大陸針對不同的食品訂出了一系列的標準如附錄六所示，大致上分為：

1. 用於蜜餞涼果、裝飾性果蔬、醃制性蔬菜、加工堅果、蝦味片、糕點上彩裝、烘烤食品餡料、飲料類、膨化食品、香辛料醬、配製酒類等最大使用量 100 mg/kg；
2. 用於風味發酵乳、調製煉乳、冷凍飲品、烘烤食品餡料、果凍，最大用量 50 mg/kg。
3. 用於即食穀物、燕麥片最大用量 80 mg/kg。
4. 用於果醬、水果調味糖漿、半固體複合調味料最大用量 500 mg/kg。

5. 用於其他調味糖漿最大用量 300 mg/kg。



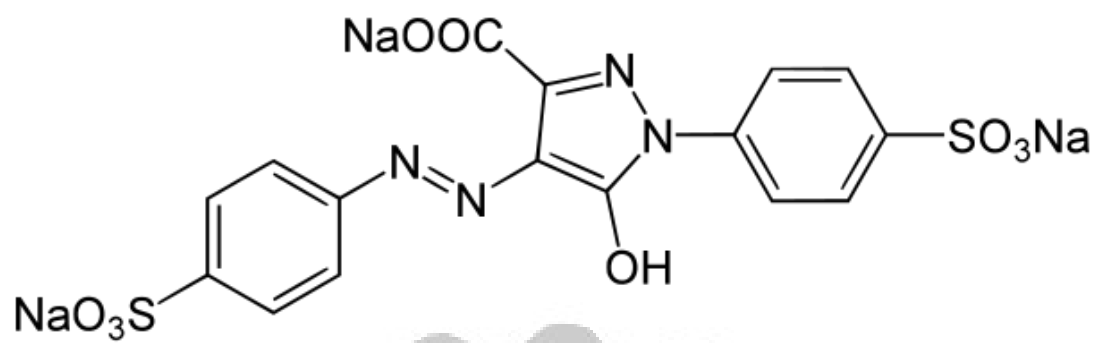


圖 2-2、檸檬黃結構式。

Fig. 2-2 The molecular structure of tartrazine (TT).



2.1.3 傳統檢測方法

過去常用於萃取食品中偶氮類著色劑的方法主要有濾膜法 (Membrane filtration) (Miniotti *et al.*, 2007; Gosetti *et al.*, 2008)、固相萃取法 (Solid-phase extraction, SPE) (Bonan *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2014)、微波輔助萃取 (Microwave-assisted extraction, MAE)、超音波輔助萃取 (Ultrasound-assisted extraction, UAE) (Sun *et al.*, 2013; Shen *et al.*, 2014) 等方法。

測定方法有分光光度法 (Spectrophotometry) (Berzas Nevado *et al.*, 1999; Kaur & Gupta, 2012)、薄層層析法 (Thin layer chromatography, TLC) (Kucharska & Grabka, 2010)、毛細電泳法 (Capillary electrophoresis, CE) (Xu, 1996; Prado *et al.*, 2006)、高效液相層析法 (High performance liquid chromatography, HPLC) (Gosetti *et al.*, 2008)。

分光光度法是利用光譜學來進行分析的方法，一般的光源為許多不同波長的電磁波所組成，當儀器將光源發出後，會穿過樣品，並經由偵測器將訊號顯示出來。2011年 Soylak 等人利用分光光度法檢測液體樣品中的 Allura Red，文獻利用 SPE 進行樣品處理，在波長 506 nm 之下檢測極限值為 $2.35 \mu\text{g L}^{-1}$ (Soylak *et al.*, 2011)。2011年 Sorouraddin 等人利用 double beam photo colorimeter 同時檢測食品中五種著色劑，利用不同著色劑在不同波長的光源照射之下會有最大吸光值的特性進行分析，其測得的回收率介於 97% 到 103% 之間 (Sorouraddin *et al.*, 2011)。2013年 Turak and Ozgur 利用 SPE 過濾飲料樣品後，比較 HPLC 以及分光光度法在同時檢測 Allura Red 以及 Ponceau 4R 之間的差異，其檢測極限值分別介於 0.059 到 0.102 以及 0.198 到 $0.341 \mu\text{g mL}^{-1}$ 之間，回收率介於 98.75 到 100.37% (Turak & Ozgur, 2013)。

TLC 為較簡單的分析法，在薄層層析板下方點上直徑約 0.3 公分的樣品以及標準品，風乾後將薄板下端約 0.5 至 1 公分浸入展開液中，展開至適當高度後取出展開槽並風乾，利用 UV 光檢視，並使用發色劑呈色，藉由分離的 retention factors (R_f) 來判斷不同的著色劑樣品，此方法可以一次分離多種著色劑，但是只能定性無法進行定量分析。2014 年 de Andrade 等人利用 SPE 固相萃取軟性飲料中的著色劑後，再利用異丙醇以及氨水作為移動相進行分離(de Andrade *et al.*, 2014)。

在高效液相層析的文獻當中包含了串聯 UV-Vis、PDA、MS 等不同檢測器。較多學者使用的分析管柱為 C_{18} 以及 C_8 。2008 年 Gosetti 等人利用逆相 C_{18} 管柱之液相層析系統分析市售餐前酒中的 E110 以及 E122 兩組著色劑。1997 年 Gennaro 等人利用逆相管柱之液相層析系統，其移動相為水以及乙睛(70:30, v/v)、5 mM 正辛胺並用 orthophosphoric acid 調整 pH 至 6.4，UV-Vis 檢測器波長設定為 520 nm，分離 E122、E123、E124 三組不同的著色劑(Gennaro *et al.*, 1997)。2003 年 González 等人利用 C_{18} 逆向管柱層析分離含乳製品中的天然以及人工合成著色劑樣品經過固相萃取的方式行處理，以水以及甲醇作為移動相進行分離(González *et al.*, 2003)。2014 年 Jurcovan 與 Diacu 用逆相管柱之液相層析系統，同時檢測軟性飲料中的 Red Allura 以及 Ponceau 4R 兩組著色劑，此文獻樣品並未經過萃取，過濾樣品後直接進行檢測(Jurcovan & Diacu, 2014)。Gan 等人在 2013 年的時候針對食品中的日落黃以及檸檬黃進行檢測，文獻中作者選擇了許多樣品，分別利用不同的方式進行處理。糖果、果凍、冰淇淋精確秤重之後利用 45°C 去離子水進行著色劑提取，後定量到 100 毫升，在利用 0.45 μ m 濾膜進行過濾，糖衣巧克力則是利用去離子水溶解外層糖衣著色劑後，再加入等量的 3 M 醋酸，軟性飲料沒有經過處理直接檢測。此篇文獻使用 C_{18} 作為層析管柱，使用甲醇、醋酸銨作為移動相，並且

設定 UV-Vis 檢測器波長為 417 nm、426 nm 檢測樣品中的日落黃以及檸檬黃(Gan *et al.*, 2013)。

台灣現行使用的檢測方法為衛署食字第 1011903531 號公告之「食品中著色劑之檢驗方法」法進行檢測(附錄九) 並使用高效液相層析法檢測其含量。此檢測方法可準確測得公告的 8 種食品著色劑含量，惟須繁瑣的處理，包含移動相配置以及樣品前處理，再加上一次檢測單一樣品至少要花費 15 分鐘，若有大量樣品須進行測定的時候時間勢必會再延長。故本研究旨在開發一套快速檢測系統，作為初步篩選的門檻工具。



2.2 電化學感測器

2.2.1 感測器原理

感測器(sensor)為感測某些物理量變化的情況，並將其轉換為電能的訊息、啟動或操作控制系統的裝置(謝，2003)。國際純粹與應用化學聯合會(IUPAC)定義感測器為能將物理量、化學量、生物量等輸入變量轉換成便於量測的電子訊號。

感測器需由一些元件組成，主要包含感應元件(recognition unit)以及轉換元件(transducer)。感應元件接受到外在環境的物理或化學變化時，會將偵測到的訊號透過轉換元件轉變成為可以量測的電子訊號(黃與莊，1999)，這些外在環境的變化可以是溫度、pH、濕度、壓力、化學反應等，感測器將這些訊號轉換後即可進行分析，可以達到準確、快速量測的目的，其原理如圖 2-3 所示。近年來感測器在各領域中皆有不同的應用，包含許多電子產品以及醫療產品，像是壓力感測器、血糖感測器等皆屬於此範疇。可以減少人體主觀感觀認知所造成的誤差。



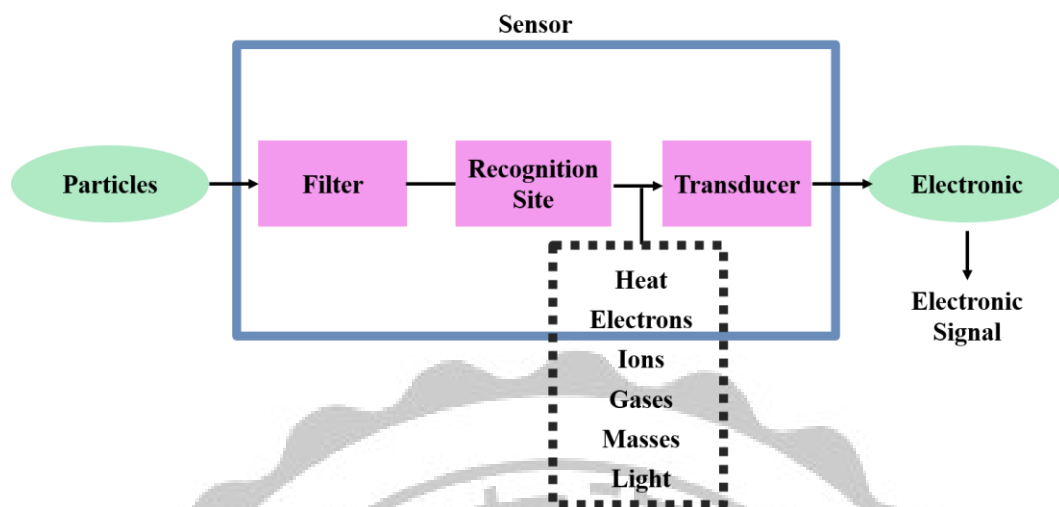


圖 2-3、感測器原理示意圖(Zorbas *et al.*, 2004)。

Fig. 2-3 Schematic representation of the principle of sensor (Zorbas *et al.*, 2004).

感測器轉換元件可以將感應元件所測到的資訊轉換成儀器可偵測的訊號，如電壓、電流、頻率、阻抗、脈衝、導電度變化等不同形式傳輸、處理記錄的訊號輸出，通常有三種不同的類型，包含電化學電極(Electrochemical electrode)之電流訊號、光學訊號(Optical signal)、光電聲波訊號(Optical-electronic acoustic signal) (Farre' *et al.*, 2005)。依照轉換元件運作的機制可以分為三類，分別是物理感測器(Physical sensor)、生物感測器(Biosensor)及化學感測器(Chemical sensor) (Zheng *et al.*, 2003)。

物理感測器是利用某些物理效應把被測量的物理量轉化成便於處理的信號裝置。主要的物理感測器有光電式感測器、壓電感測器、壓阻式感測器、電磁式感測器、熱電式感測器、光導纖維感測器等。這些物理感測器常常出現在我們的生活當中，像是指南針即是最早出現磁感測器，現今在更進一步將磁感測器的訊號以電訊號輸出，以便後續訊號處理。

化學感測器(Chemical sensors)通常是指體積小，靈敏度高且對特種有機，無機或生化醫學物質具有相當高選擇性之偵測器(施，2001)，故化學感測器能將量測物的化學訊號像是濃度、成分組成等，轉換成其他訊號的裝置。一般常見的化學感測器依照其感測元件可以分為六個種類(施，2001)，分別是：

(1) 電化學感測器 (Electrochemical sensors):

利用待測物電化學氧化還原或所引起的感應元件阻抗之改變而發展出來之感測器。

(2) 壓電晶體化學感測器 (Piezoelectric crystal chemicalsensors):

利用壓電晶體之共振頻率會因表面吸附待測物而改變開發出來之感測器。

(3) 光化學感測器 (Optical sensors):

利用待測物吸收特殊波長之光波或發出螢光而設計之感測器。

(4) 生物化學感測器 (Bio-sensors):

利用生生物質(如酵素及抗體)或其他化學感應材料以感應偵測生化醫學樣品(如葡萄糖，尿酸等)。

(5) 表面聲波 (Surface acoustic wave, SAW) 化學感測器:

利用高週波(100-300 MHz)聲波通過含待測物之壓電薄膜表面產生高週波頻率或波速變化而設計之感測器。

(6) 微晶片 (Microchip) 微化學感測器 (Micro-sensors):

將整個感測器(含感應元件及換能器)全部嵌入一微小晶片中而製成微感測器，用在一般化學及生化微晶片分別通稱為化學晶片及生物晶片，微晶片化為各種化學感測器發展之最後目標。

化學感測器在日常生活中或者是分析、檢測的領域中使用十分廣泛，像是酒精感測器、pH meter、車輛中的氧氣感測器以及環境污染檢測等應用。

生物感測器(biosensors)是由具特異性(specificity)之生物辨識元件與可將生化性訊號轉變成處理及顯示訊號之轉換元件(transducer)

所組成之分析儀器。1996年 IUPAC 組織對生物感測器之定義為：「生物感測器為一個使用生物性的識別元件，與訊號轉換元件結合，可提供特定的定量或半定量之分析訊號」。在生物感測器中，一樣具有生物辨識元件 (Biological recognition element)、信號換能器 (Signal transducer) 及訊號處理器 (Signal processor) 三個元件所構成，其中以生物辨識元件為整個生物感測器的核心，通常為具催化作用的酵素、微生物、組織等，或是不具催化作用之親和性抗體 (antibody)、受體 (receptor)、核酸等作為辨識元件，因為可透過生物辨識元件的高專一性、高靈敏度，將外界環境中待測的因子進一步經由信號換能器轉成為其他電子訊號以利於後續訊號處理器進一步分析處理。

感測器應用於食品著色劑分析並不普遍。一般評估感測器的效能包含(黃，2006):

1. 靈敏度 (sensitivity):

其定義為輸出訊號變化與待測量變化之比，當線性度良好時，可視為校正曲線的斜率。

2. 再現性 (repeatability):

指相同條件之下，同一待測量重複輸入量測，轉換器產生相同結果的比率。重現性愈大表示轉換器的可靠度愈高。

3. 線性度 (linearity):

指轉換器校正曲線接近於理想直線的程度，一般而言，轉換器的應用必須在線性度良好的範圍內，此時為定值常數之靈敏度可視為校正曲線斜率斜率。

4. 穩定度(Stability)：

感測器在使用或儲存一段時間後，對於檢測待測物的訊號是否會改變。影響因素包含溫度、濕度、或是感測元件老化，皆可能造成穩定度下降。

5. 干擾(Interference)：

在複雜的感測環境中，除了待測物質有感測訊號外，其他物質的存在對待測物質的干擾，及其占總訊號的比例是否影響結果判讀，有效地排除干擾為感測器重要的指標。



2.2.2 電化學分析方法

電化學分析方法是利用測量待測樣品的電位、電流或電阻進一步推算樣品濃度的分析方法。其反應原理為伴隨電荷(通常是電子)轉移的化學反應，藉由改變電位以調整電極表面電子的能量，使電活性的物種(Electroactive species)能夠與電極發生電荷轉移的反應(胡，2011; Bard & Faulkner, 2001)電化學分析法目前應用的層面十分廣泛，包含了定性以及定量分析。此分析技術的優點主要有：

1. 較低的檢測成本
2. 較短的分析時間
3. 可針對分析物提供較多的電活性資訊

本研究使用的電化學檢測儀器的電極為三電極系統，其組成的結構如圖 2-4 所示，三組電極分別為工作電極(Working electrode, WE)、參考電極(Reference electrode, RE) 和輔助電極(Counter electrode, CE)；其分別功用(Zoski, 2007)為：

1. 工作電極：

工作電極所扮演的角色為研究、測試所使用的電極，可以依照不同的分析物或者是修飾方式做選擇。此電極的特色是沒有固定的陽極或陰極，因為會視反應的不同有所變化。若在電極發生氧化反應，工作電極為陽極；反之則為陰極。

2. 參考電極：

參考電極主要是準確設定工作電極上之電位，所以在整個系統應用的電流範圍中此電極本身電位必須盡量維持在一

固定值；因此，理想的參考電極之電化學性能必需具備四種特性，首先其特性需近似於理想非極化電極(Ideally non-polarized electrode)；第二則是可逆性與穩定性良好；第三為遵守冷士特方程式(Nerest equation)；最後是容易校正。一般常用的考電極有銀—氯化銀(Ag/AgCl)或甘汞電極(Calomel electrode)，甘汞電極相對於標準氫電極(S. H. E)電位 0.244V；銀/氯化銀電極相對於標準氫電極(S. H. E)電位為 0.199V。

3. 輔助電極

輔助電極與工作電極成對，故其特性與工作電極類似，並沒有固定的陽極或陰極，而是隨著工作電極改變而改變，故可為陰極或陽極；此電極上發生的電化學反應以不影響工作電極為原則。一般常使用白金絲做為輔助電極(Zoski, 2007)。

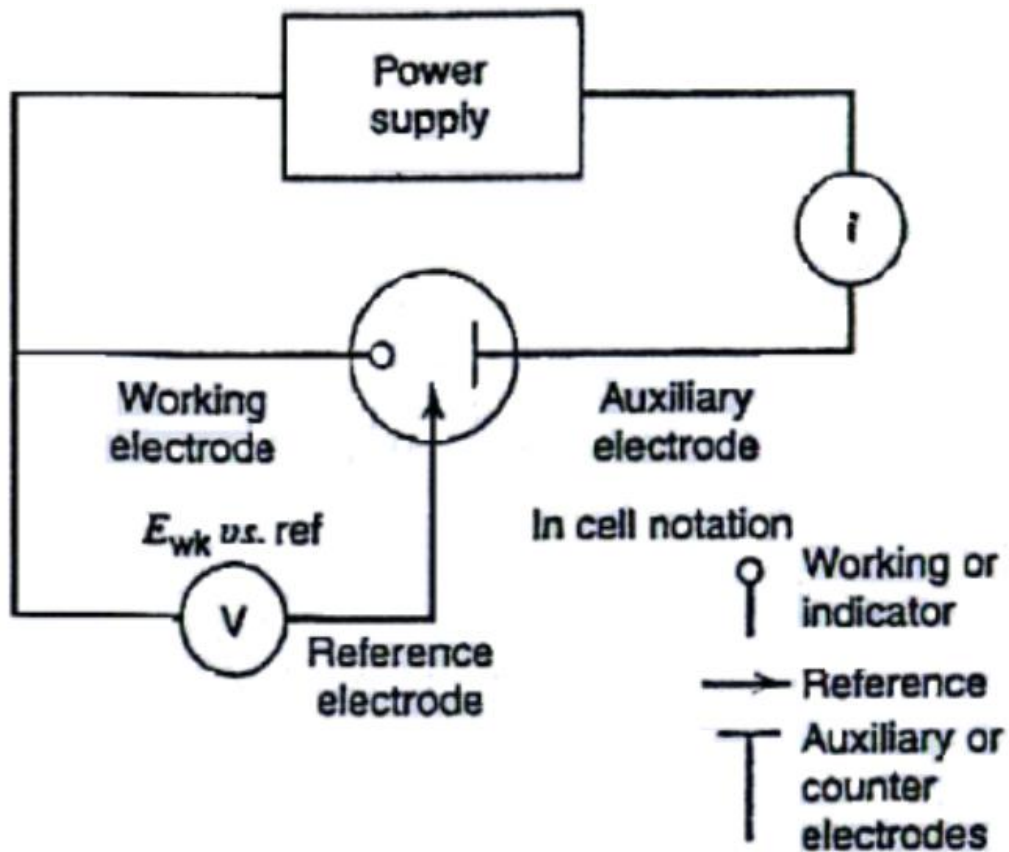


圖 2-4、電化學三電極系統意圖(Bard & Faulkner, 2001)。
 Fig. 2-4 Schematic representation of the principle of the three-electrodes system (Bard & Faulkner, 2001).

電化學分析方法有許多種類，大致上可以歸納出兩種，如圖 2-5 所示，分別為介面方法及總體方法。介面方法以電極表面和鄰近電極表面的溶液薄層間介面所發生的現象為依據做檢測分析，具有較多用途，相對的總體方法是根據發生在整個溶液中的現象，並盡力避免界面效應。介面方法可以分為大範圍：動態以及靜態，依電化學電池操作時是否有電流而定。靜態方法採用電位測量，具有速度及選擇性的關係；動態介面法有數種形式，一般而言，這些方法靈敏且有相當寬的動態範圍(約 10^{-3} M 至 10^{-8} M)，具有低偵測極限(Skoog *et al.*, 2007)。

電化學應用在生物感測器的領域當中，較常運用到的分析方法為循環伏安法(Cyclic voltammetry, CV)、方波伏安法(Squarewave voltammetry, SWV)、微分脈衝伏安法(Differential pulse voltammetry, DPV)、線性伏安法(Linear sweep voltammetry, LSV)電化學阻抗分析法(Electrochemical impedance spectroscopy, EIS)等，本文獻使用的分析方式為循環伏安法。

循環伏安法在分類上屬於伏特安培法(Voltammetry)的一種，為有效鑑定分析物氧化還原特性的方法。伏特安培法為：利用不同的能階變化，產生電子轉移的現象，會進一步造成電流變化，並可以利用電流訊號與電位之間的關係作圖，得到電位-電流的曲線。然而物質本身的能階高低也不同，圖 2-6 表示電極與物質之間的能階圖；當掃描至特定電位時，溶液中的特定物質會擴散至電極表面進行氧化或還原反應(Bard & Faulkner, 2001)，即產生電子轉移。循環伏安法是線性伏安法的延伸應用，因可以在設定的電位範圍中來回循環掃描，所以稱作循環伏安法，在掃描的過程當中，當電位隨時間逐漸減少時，稱為負掃描，其電流-電位圖中會在陰極出現峰電位(E_{pc})以及峰電流(i_{pc})；同樣地，當電位隨時間逐漸增加時，稱為正掃描，其電流-電位圖中會在陽極出現峰電位以及峰電流，此為電化學分析中重要的參數。典型的循環伏安法掃描電位對時間作圖結果如圖 2-7 所呈現，掃描的圖

型為對稱鋸齒波型(Symmetrical saw-tooth waveform)，其中包含一些重要的參數，包含起始電位(E_i)、上限電位(E_{su})、下限電位(E_{sl})、掃描速率(ν)。完成掃描之後，利用電位-電流進行作圖後可以得到如圖 2-8 的結果，得到的資訊包含陽極峰電(Anodic peak current, I_p^A)流、陽極峰電位(Anodic peak potential, E_p^A)、陰極峰電流(Cathodic peak current, I_p^C)、陰極峰電位(Cathodic peak potential, E_p^C)。將電位改變及循環伏安法結果紀錄上下對照，可以清楚了解循環伏安法結果圖在不同電位下之變化。電流訊號扣除背景電流訊號之後就可以得到其峰電流值，可以根據峰電流的大小分析待測物濃度。



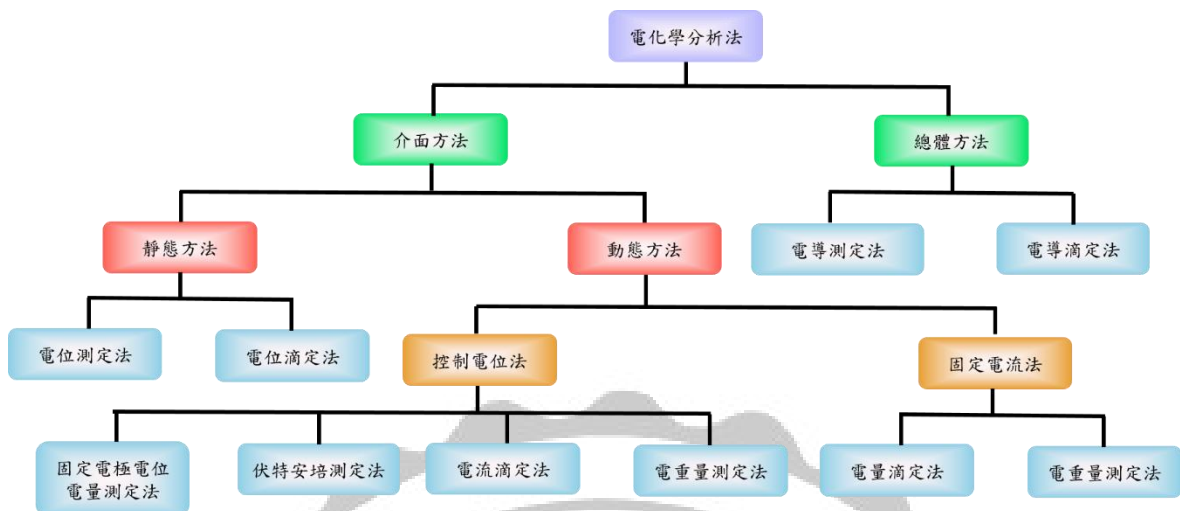
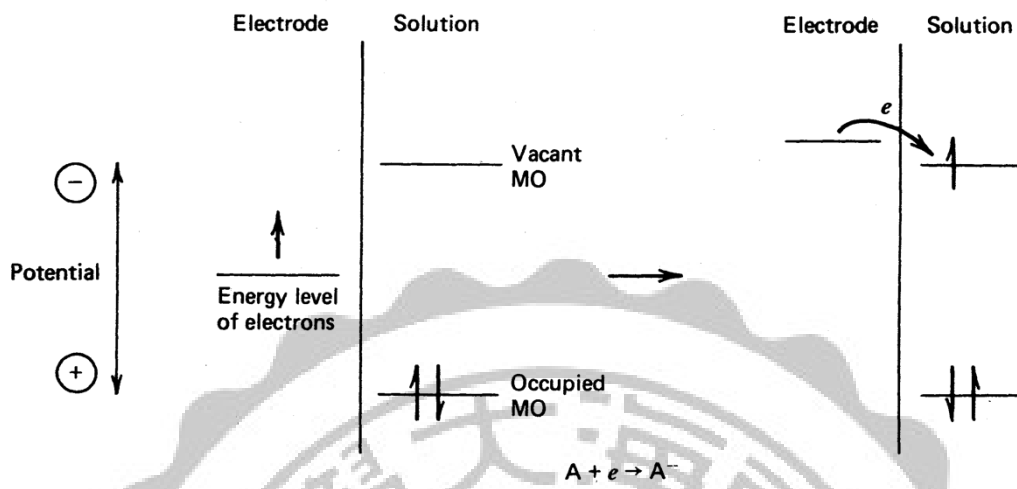


圖 2-5、電化學分析法大綱(Skoog *et al.*, 2007)。

Fig. 2-5 The outline of electrochemical analysis (Skoog *et al.*, 2007).

(A)



(B)

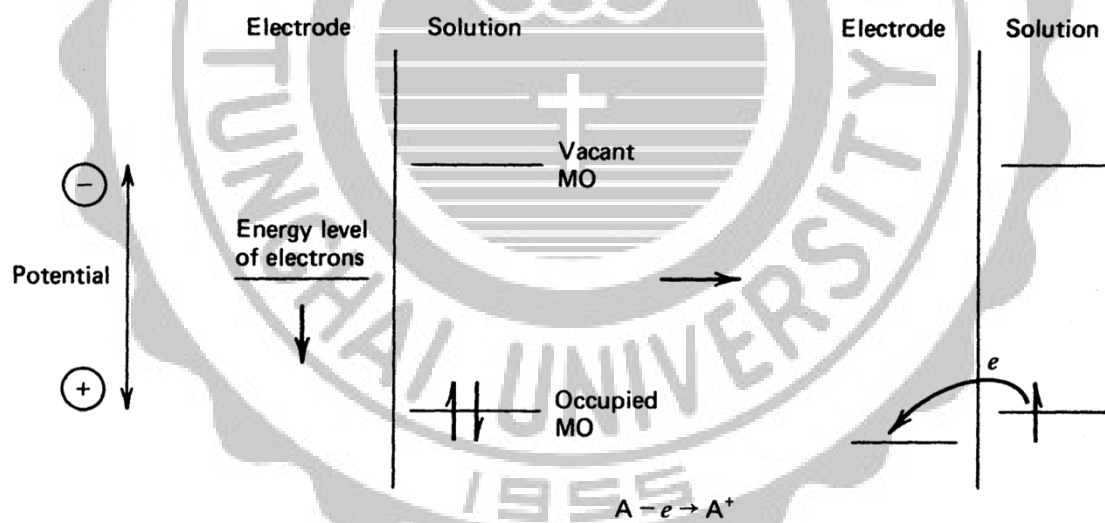


圖 2-6、檢測 A 溶液之電極表面之能階圖(Bard & Faulkner, 2001)。(A)還原反應。(B)氧化反應(Bard & Faulkner, 2001)。

Fig. 2-6 Representation of (A) reduction and (B) oxidation process of energy levels in A solution (Bard & Faulkner, 2001).

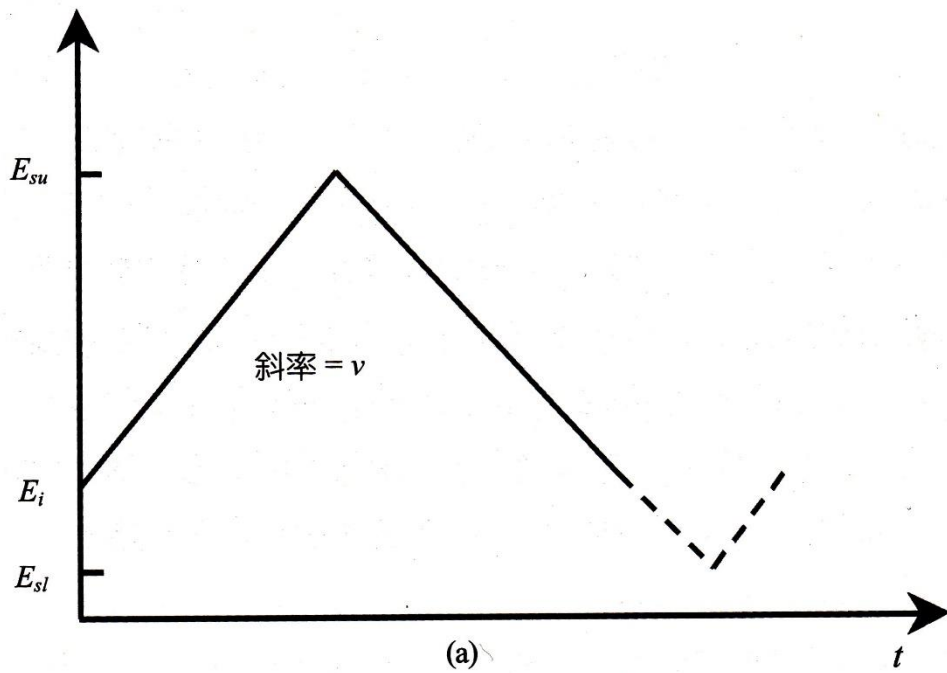


圖 2-7、循環伏安法電位變化對應時間變化關係(胡，2011)。
Fig. 2-7 The relationship between potential variation and time (胡，2011).

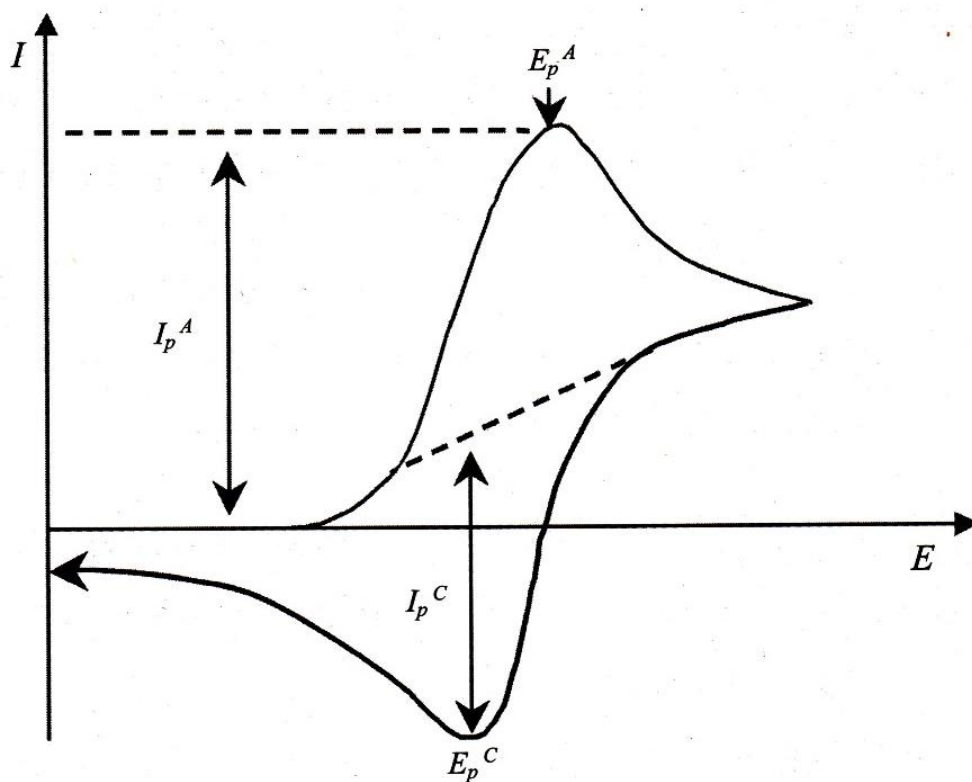


圖 2-8、循環伏安法電位變化對應電流變化關係(胡，2011)。

Fig. 2-8 The relationship between potential variation and current variation (胡，2011).

2.2.3 電化學工作電極種類與特性

利用電化學方法進行分析物檢測的過程當中，工作電極扮演很重要的角色，因為分析的效果往往跟電極的種類有很大的關係，因此，在開發一套檢測系統的過程中，必須要考量到檢測物發生氧化還原與不同電極之間的關聯性，以及電及材質結構與背景電流的關係，此外還有導電性、機械性、成本、再現性、以及工作的電位範圍等因素，皆為工作電極重要的特性。

常用的工作電極包含了銅、金、白金、玻璃碳(glassy carbon, GCE)、石墨、摻硼金剛石(dope boron diamond, BBD)、碳膠、碳纖維等材料。其中碳電極的特性包含了工作電位範圍廣、穩定性高、背景電流值小，另外其分析的物質種類也很多，像是葡萄糖、抗壞血酸、兒茶酚、尿酸、食品添加物等等，而且碳有很多中形式，故在近年來有許多應用。

但是使用裸電極進行分析往往會有極限，到達一定門檻後便難以有新的突破。此外在使用裸電極進行電化學分析的過程當中，電極的表面可能會有與分析物、反應中間產物或者其他干擾物發生吸附的現象，隨著掃描的時間拉長，可能影響電極表面催化活性面積，進一步影響再現性與靈敏度(Wang & Hutchins-Kumar, 1986)。為了改善這項缺失，讓電極有更加的靈敏度及再現性，修飾電極的領域開始快速發展起來。

網版印刷電極具有可拋棄、低成本、容易修飾的特性(Bernalte *et al.*, 2012)，所以在電化學分析領域裡面很常被使用。根據文獻指出氧氣電漿修飾可增加碳的比表面積及氧官能基(包括了 C-O、C=O 及-COO 等)，而具有氧官能基的碳會有較高比表面積，能儲存更多的電荷在電極的表面，使電流密度提升，進一步增加檢測樣品的電流訊號(Cascarini *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 1996)。此外，網版印刷電極的表面在經過氧氣電漿修飾過後從原本為疏水性轉變成為

親水性(Cascarini *et al.*, 1998)，疏水性表面會使溶液無法充分濕潤電極，導致反應較差、訊號靈敏度降低。在氧氣電漿的修飾過程中，首先，使用之前會先將樣品放入反應腔體內，接著打開高壓鋼瓶，讓氧氣經過流速控制器之後，以 500 (cc/min)的流量進入反應腔體中，等待約 15 分鐘讓流速穩定之後，在開啟電源供應器，使電位經由變壓器增壓到設定的條件之後，即可使反應腔體中的氣體離子化，進一步形成電漿，再針對放在腔體中的樣品進行表面修飾。



2.2.4 電化學電極改質方法

電化學領域中為了讓檢測系統有更佳的專一性、靈敏度且準確分析出結果，修飾電極一直是眾多學者努力鑽研的方向。常見的修飾電極方法有三種，分別是化學修飾法(Chemically modified electrode, CME)、酵素修飾法、DNA 修飾法(Barroso *et al.*, 2011)。其中比較常見的修飾方法為化學修飾法，最簡單的方式為直接將修飾物(Modifier)塗覆於待修飾電極表面，改變其結構或者賦予特殊官能基，使其除了原本的裸電極外而外增加其他機能，像是電荷極性、離子交換能力、氧化還原特性等，可進一步突破傳統電極限制。故修飾方式選擇十分重要，理想的化學修飾電極須具備(鍾與曾，2001)：

1. 製造方法簡單
2. 有良好的機械與化學性質
3. 不錯的再現性與穩定性
4. 背景電流必須低且穩定
5. 可適用於不同溶劑組成的溶液中等條件

常見的化學修飾電極方法主要可以分為以下四種(Damien, 1994)：

1. 單層吸附法(Monolayer adsorption)

將修飾劑直接吸附於電極表面。最早為 Lane 與 Hubbard 提出的修飾方法(Lane & Hubbard, 1973)，其原理為利用電極表面與待修飾物之間的作用力而吸引，其作用力包含了凡得瓦力、原子力、親疏水性作用力等，可以將修飾物吸在電極表面上。其特性為修飾過程容易，且應用的範圍非常廣，但是往往吸附於電極表面的修飾物只有一層，在掃描的過程當中容易剝落，使得修飾的效果降低。

2. 共價鍵修飾法(Covalent modification)

以共價鍵讓修飾劑與電極表面特定官能基鍵結，並固定在電極表面上。由於共價鍵的吸引力比較強，所以修飾完成的電極修飾物較不容易脫落，但是容易受到檢測環境中的 pH、離子濃度變化而影響到分析的結果。

3. 高分子修飾法(Polymer modification)

在電極表面修飾含有離子交換能力的高分子薄膜，像是全氟硫酸聚合物(Nafion) (Cha *et al.*, 1993; Martin *et al.*, 1982)、聚乙烯吡啶(PVP)等離子交換之聚合物，可分別對陽離子或陰離子進行交換作用而達到預濃縮之效果。

4. 電化學沉積法(Electrochemical deposition)

將電極放置於含有修飾劑的溶液中，在透過外加電位使修飾物沉積在電極的表面上，並可以透過不同的修飾時間、

修飾電位達到不同的目的，針對不同的需求建立最合適的修飾電極。



化學電極的製作方式並非侷限於上述一種特定方式，可以透過兩種或是多種方式的組合來達到提升專一性或是其他的目的，其原理可大略分為四類(Arrigan, 1994；Gilmartin & Hart, 1995)：

1. 選擇性的預濃縮(Selective preconcentration)：

利用修飾物本身對分析物之選擇性，經由螯合、離子交換或吸附過程，將分析物沉積於電極表面，達到預濃縮之效果。

2. 滲透選擇性(Permselectivity)：

在電極表面修飾具半滲透特性的高分子薄膜，藉此阻擋非待測物電活性物質所造成的干擾，以增加電極選擇性，同時可以預防環境中其他大分子附著於電極表面造成電極活性面積降低而影響電極之檢測穩定度，造成檢測結果誤差。

3. 選擇性識別(Selective recognition)：

選擇性識別是生物感測器中相當重要的一環；生物檢體如血液、尿液等所包含的基質十分複雜，因此在檢測這類物質時，電極需具有極高的選擇性才能避免干擾。通常此類型的修飾電極應用最為廣泛的修飾物為酵素 (Enzyme)；酵素具有高度專一性，非常適合應用於生物檢體分析。其檢測原理可分為兩類：一類為藉由偵測酵素與受質(Substrate)作用後所產生之訊號，間接推得分析物質濃度；另一類則是直接偵測酵素受質的訊號。

4. 電催化的應用(Electrocatalysis)：

電催化反應主要在降低電極表面電荷轉移時的活化能，進而降低過電壓。為了解決分析物的過電壓問題，在電極表面塗覆一層電子轉移物質，藉由其催化功能可使反應活化能降低，加速分析物在電極表面的反應，進而達到提升靈敏度之目標。

5. 電漿(Plasma)：

電漿修飾主要目的是在電極表面接枝，可以提高電荷儲存在電極表面的密度。在電漿修飾的過程當中，氣體經由高壓電場電離產生的離子、電子、自由基、短波紫外光等，針對電極表面進行轟擊，使其結構發生變化，在電極表面上發生物理或化學反應，這些反應類型有交聯、蝕刻、沉積、表面官能基化 (吳等，2004)。



2.3 電漿

電漿最早是 1920 年時，Langmuir 等人操作氣體放電實驗時發現的，當時觀察到電子管中的狀態與細胞質相似，到了 1929 年時 Langmuir 用電漿(plasma)來敘述當時觀察到氣體電離化的現象(孟，1969)。

2.3.1 電漿型態

一般我們熟知的狀態之下物質有三態，以生活中的水為例子，在常溫常壓之下，水會以液態的形式存在，當溫度降低時，分子間互相束縛的能力漸漸變強，以至於相對位置被固定，形成固體；當溫度升高時，水分子的動能漸漸增加，當完全脫離固定位置的束縛能時，即成為可以自由移動的氣體。

一般的物質皆是由原子組成，原子又包含原子核、以及外圍帶負電的電子，當物質以氣態存在時，電子會受到電場的束縛在原子核外圍旋轉，此時當溫度提高，電子的動能漸漸提高，當超過原子核電場的束縛能時，便會脫離原本的軌道，形成自由電子，即為電離現象，可以依照其電離的程度分為完全電離以及部分電離，以嚴格的定義來說，當電離度到 100%時稱作等離子體，也就是電漿。廣義的定義中，在部分電離氣體中，只要達到一定條件，也通稱為電漿。

電漿是原本中性物質經由高能量激發、離子化產生的，主要由生分子(molecules)、原子(atoms)、受激態物質(excited species)、電子(electrons)、正離子(positive ion)、負離子(negative ion)、自由基(free radical)、UV 光、可見光等物質組成，因其性質異於我們熟知的固、液、氣三態，所以電漿也被稱作物質的第四態(徐與高，2004)。

2.3.2 電漿生成原理

物質從氣態要電離產生電漿的過程必須十分大的能量，一般情形之下能量往往是不足夠的，因此需要額外提供能量，常見的能量除熱能之外，在目前業界較常用的能量為電能，在電極上施加電壓，使環境中產生電場，電子在此環境中會被帶正電的電極吸引，漸漸提高旋轉的速度，在此過程中累積能量，到達一定上限後便有能離離中性氣體原子，此時游離電子經由撞擊其他中性氣體原子產生更多由離電子，反覆進行之後，即可使氣體電離，形成電漿(董與陳，2002)。



2.3.3 氧氣電漿修飾電化學電極之作用與機制

在過去十幾年的時間當中合成材料的發展十分迅速，由其在材料表面修飾的部分，可以使其擁有較佳的生物相容性，或者是一些附加機能的功能，因此近年來有許多合成材料表面修飾的方法已經被開發出來，常見的修飾方式如表 2-4。而電漿修飾的過程當中僅會針對表面進行修飾，一般來說深度大約只有數百 Å 到 10 μm 之間(吳等，2004)，故不會影響到材料本身的性質，再加上可以藉由修飾的過程當中使用不同的參數，像是修飾的時間、壓力、氣體、功率等等條件來達到不同的修飾目的，讓材料表面有多樣化的組成特性。

在電漿修飾的過程當中，具有作用能量的物質包種類含了離子、電子、自由基、短波紫外光等，藉由針對待修飾物表面進行轟擊，進一步使其結構發生變化，修飾的過程中會發生巨大能量轉移，在待修飾材料的表面上發生物理或化學反應，這些反應類型有交聯、蝕刻、沉積、表面官能基化(吳等，2004)，反應如圖 2-9 所示。

1. 交聯(Crosslinking)

藉由電漿氣體離子或介穩態物種(metastables)針對待修飾物進行碰撞之後，待修飾物表面上的淺層結構或者高分子結構中的部分原子(大多為氫)被移走，移走後會形成不同分子鍊之間可以交聯的位置，再透過不同分子之間的交聯使得結構表面的強度與硬度增加。一般常使用的氣體為惰性氣體(He、Ar 等)。

2. 蝕刻(Etching)

利用電漿氣體中的離子或電子，針對待修飾物表面進行轟擊過後，透過能量轉移使得待修飾基材表面分子結構發生

變化，主要的作用是打斷分子之間的共價鍵，使基材表面產生新的小分子，或者是在轟擊的過程當中，藉由電漿與表面分子的反應產生揮發性氣體，進一步從基材的表面中脫離，故此反應可能會造成基材厚度發生變化。通常使用的電漿工作氣體為惰性氣體或者反應氣體(如氧氣)，可以視處理材料的性質或者需求的不同而定，甚至可以採用混和的氣體系統。

3. 沉積(Deposition)

通常為利用具有電漿聚合性的氣體作為工作氣體，像是 C_2H_2 、 C_2F_4 等氣體，在電漿修飾的過程當中，自由基會進行聚合，接著沉積在待修飾物的表面上，形成一層高分子薄膜，沉積完成後的基材表面除了有較高的緻密性以外，提升了基材之間的附著力。

4. 表面官能基化(Functionalization)

電漿使基材表面官能基化的部分主要有兩個步驟，首先在反應氣體形成電漿的過程當中，基材表面較弱的鍵結會先被電漿活性粒子破壞，接下來會被反應氣體解離的高反應性官能基取代，取代的官能基會隨著反應氣體的不同而有所變化，一般常用的反應氣體為 O_2 、 H_2 、 N_2 、 NH_3 等氣體，而常見的反應官能基包含了 $-OH$ 、 $-COOH$ 、 $-C=O$ 、 $-NH_2$ 等官能基，伴隨著這些官能基的產生，可以達到活化表面高分子的效果，進一步增加基材表面的反應活性、黏著性、浸潤性等等。

隨著技術的改進，近年來有許多學者使用電漿來進行電化學電極改質。其中不乏以石墨、玻璃碳進行改質的研究。Cascarini De Torre 等人在 1998 年利用氧氣電漿進行石墨化碳黑表面改質修飾，經過水接觸角的實驗之後發現其表面性質由疏水性轉變成為親水性，到了 2000 年，Li 與 Horita 以 RF 氧氣電漿進行石墨化碳黑表面改質修飾，

結果發現石墨化碳黑表面的含氧官能基數量增加，包含-C=O、-COOH 等官能基；Li 等學者在 1996 年時利用 RF 氧電漿改質碳黑，其電漿的工作氣體為氧氣，在工作壓力為 1.5 torr 之下發現當其時間越長，其-C=O 的官能基越多。在 2005 年時，Okajima 等學者利用氧氣電漿修式活性碳纖維，研究發現在功率 30 W；氧氣與氮氣 1:10 的條件之下，修飾時間為 1 分鐘時會產生較多的 quinone 官能基，同時有較高的電容值(Okajima *et al.*, 2005)。

基於以上的特性，推測在經由氧氣電漿改質後的網版印刷電極可增加比表面積及氧官能基(C-O、C=O 及-COO 等)，而具較高有含氧官能基與高比表面積的電極的表面能儲存更多的電荷(Cascarini *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 1996)，使電流密度提升，進而提高檢測的電流訊號。此外，疏水性表面會使溶液無法充分濕潤電極，導致反應較差、訊號靈敏度降低，經由氧氣電漿修飾過後的電極具較多的含氧官能基，能夠將電極轉變為較親水性的表面性質。另外此種改質方法只單純對表面進行改質，並不會影響網版印刷電極原有的化學及物理性質，故在本研究使用氧氣電漿進行網版印刷電極的表面修飾。



表 2-4、常見合成材料表面處理方法(吳等，2004)。

Table 2-4 Common surface modification techniques (吳等，2004).

Physical	Chemical	Radiation
物理吸附 Langmuir-Blodgett 薄膜	強酸氧化 臭氧處理 化學吸附 火焰處理	輝光放電電漿 電暈放電 紫外光 雷射 離子束 電子束 γ 射線



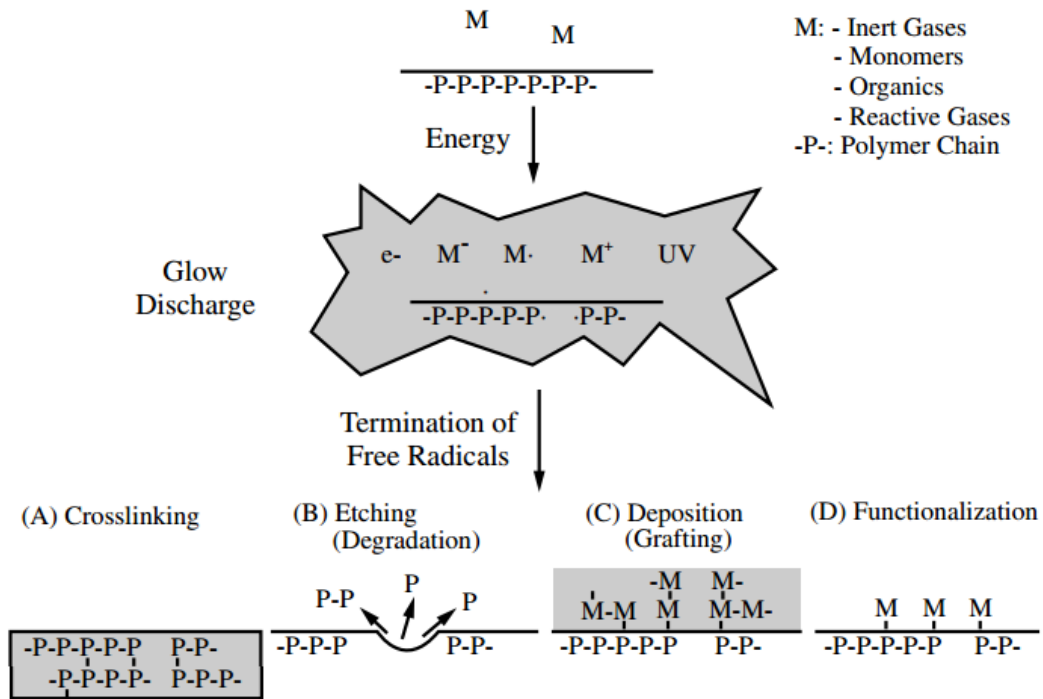


圖 2-9、電漿表面處理的反應機構示意圖(吳等，2004)。

Fig. 2-9 Mechanism of plasma surface modification (吳等，2004).

2.4 電化學分析法於檢測食品著色劑之應用

利用電化學檢測食用著色劑日落黃以及檸檬黃的文獻當中，在過去 20 幾年之間已有一些研究。1990 年時，Dominguez 等學者用 Differential-pulse polarography 檢測食品中的日落黃以及檸檬黃。但是得到的檢測結果標準曲線濃度範圍為 0.1–10 ppm (Dominguez *et al.*, 1990)，其可以應用的範圍較狹隘。一直到近十幾年來，開始有學者使用各種不同的材料進行電極表面修飾，才有新的突破。

2009 年 Zhang 等人利用多壁奈米碳管進行玻璃碳電極表面修飾，並將反應槽先置入緩衝液和電極，待電流訊號穩定後加入日落黃或檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生及電流訊號測定樣品中日落黃或檸檬黃濃度。此篇文獻的樣品為市售果汁中的檸檬黃以及日落黃，其電極修飾的方式為：將玻璃碳電極利用氧化鋁粉末進行拋光後以去離子水清洗，接著使用超音波震盪裝置震盪清除表面附著物。完成之後取 20 毫克的多壁奈米碳管、10 毫克的 dihexadecyl hydrogen phosphate (DHP) 後，加入 10 毫升去離子水並利用超音波震盪機震盪 30 分鐘使其均質之後，取 5 μ l 進行玻璃碳電極表面修飾。結果顯示 pH 8 的 PBS buffer 具有較佳的靈敏度，檢測線性範圍日落黃為 25 ng mL⁻¹ 到 5 μ g mL⁻¹，檸檬黃為 0.2 μ g mL⁻¹ 到 40 μ g mL⁻¹ (Zhang *et al.*, 2009)。

2010 年 Song 同樣使用多壁奈米碳管進行玻璃碳電極表面修飾，檢測軟性飲料中的日落黃。首先將緩衝液和電極置入反應槽中，待電流訊號穩定後加入日落黃或檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電流訊號測定樣品中日落黃或檸檬黃濃度。在此篇文獻中奈米碳管有經過酸化處理：取多壁奈米碳管並加入濃硝酸，在沸騰的環境之下處理三小時，其修飾的步驟與 Zhang 等人大致相同，唯超音波震盪懸浮步驟使用乙醇以及去離子水取代 DHP。其反應機制

如圖 2-10 所示。檢測的線性範圍分為兩個區域，分別為 1.2 mg L^{-1} 到 125 mg L^{-1} 以及 125 mg L^{-1} 到 256 mg L^{-1} 之間(Song, 2010)。



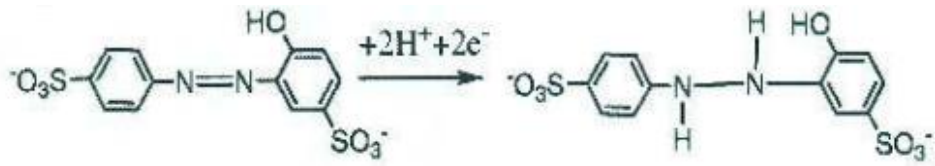
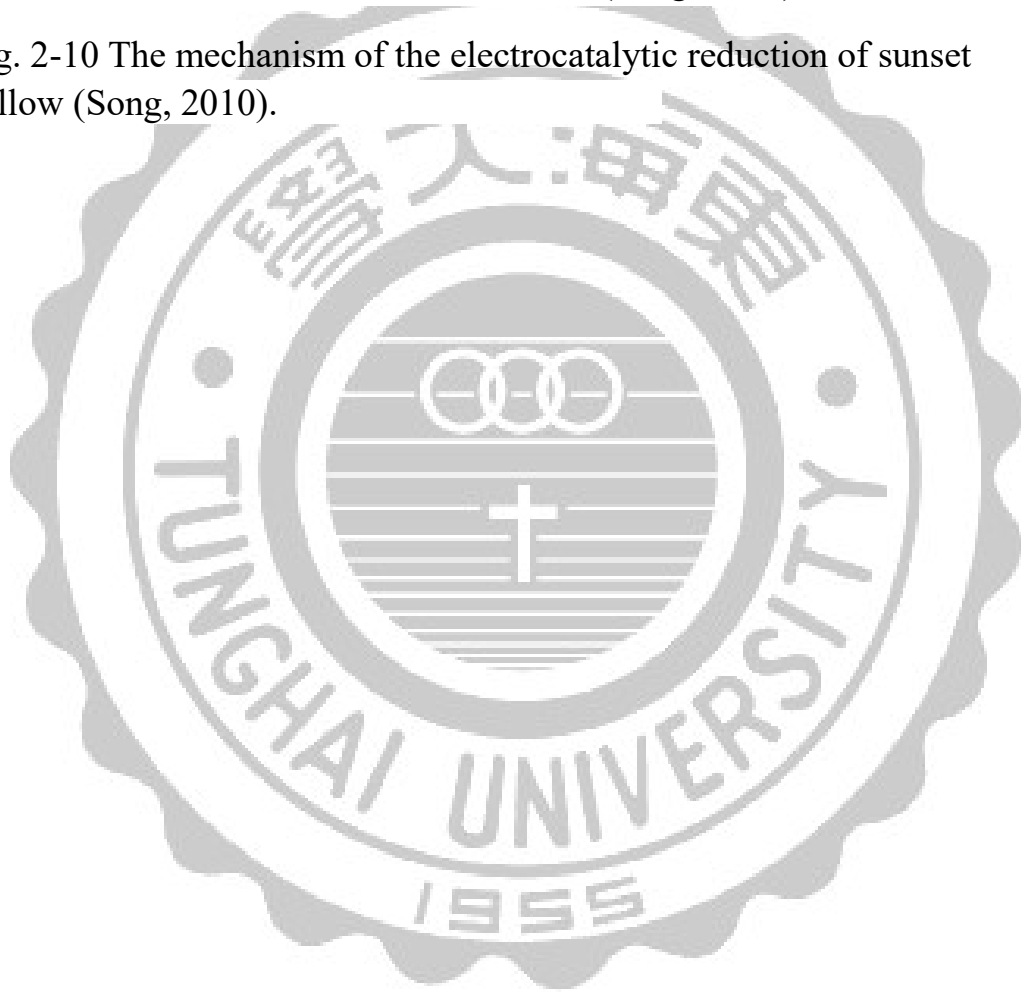


圖 2-10、電化學檢測日落黃之反應機制(Song, 2010)。

Fig. 2-10 The mechanism of the electrocatalytic reduction of sunset yellow (Song, 2010).



2011 年 Ghoreishi 等人使用多壁奈米碳管修飾碳膠電極，檢測軟性飲料中的 Tartrazine 以及 Brilliant Blue。在檢測之前先在反應槽中置入緩衝液和電極，待電流訊號穩定後加入亮藍以及檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電流訊號測定樣品中亮藍以及檸檬黃濃度。在此篇文獻中，多壁奈米碳管並不是如 Song 以及 Zhang 等人利用多壁奈米碳管進行電極表面修飾，而是在製作碳膠電極的過程當中直接混入多壁奈米碳管，再一起進行電極填充，其步驟分別為：取 78% (w/w) 石墨粉 (graphite powder) 以及 2% (w/w) 多壁奈米碳管，加入 10 毫升去離子水之後，利用超音波震盪裝置均質 30 分鐘。待水分蒸散完畢之後，加入 20% (w/w) paraffin oil。對照組則使用 20% (w/w) paraffin oil 以及 80% (w/w) 石墨粉進行混和。混合均勻之後將碳糊填裝入直徑 2 mm 的電極當中，並使用銅線當作連接碳糊的導線。電化學反應槽中的緩衝溶液為 pH 2 的 PBS 緩衝溶液。檸檬黃在此系統中的檢測靈敏度為 $1.11 \mu\text{A} \mu\text{mol}^{-1}$ ；其線性範圍為 $0.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ 到 $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ 之間(Ghoreishi *et al.*, 2011)。

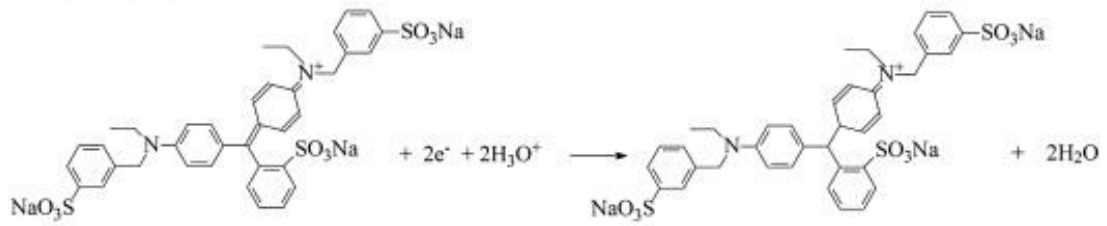
2012 年 Medeiros 等人使用參硼金剛石電極(boron-doped diamond, BDD)檢測運動飲料、果汁、果凍中的日落黃、檸檬黃以及亮藍。檢測的方式是將反應槽置入緩衝液和電極，待電流訊號穩定後加入亮藍、日落黃以及檸檬黃等待測著色劑，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電流訊號測定樣品中著色劑濃度。其 azo colorants 在 BDD 電極表面發生還原反應的機制圖如圖 2-11 所示。文獻中使用的電化學掃描方式為微分脈衝伏安法(Differential-pulse polarography)。使用的電解液為 0.1 M H₂SO₄。利用此系統檢測出來的線性範圍分別為：日落黃 $0.049 \mu\text{mol l}^{-1}$ 到 $2.9 \mu\text{mol l}^{-1}$ ；檸檬黃 $0.35 \mu\text{mol l}^{-1}$ 到 $9.1 \mu\text{mol l}^{-1}$ ，檢測極限值為 $0.0131 \mu\text{mol l}^{-1}$ 以及 $0.0627 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Medeiros *et al.*, 2012a)。

2012 年 Medeiros 等人使用參硼金剛石電極一樣檢測運動飲料、果汁、果凍中的日落黃、檸檬黃以及亮藍。文獻中使用 0.1 M H₂SO₄ 作為電解液，與先前的文獻較不一樣的地方是，此篇文獻使用 flow injection 的方式進行檢測。利用此系統檢測出來的線性範圍分別為：日落黃 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ；檸檬黃 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 60 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ，檢測極限值為 0.8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 以及 2.5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Medeiros *et al.*, 2012b)。





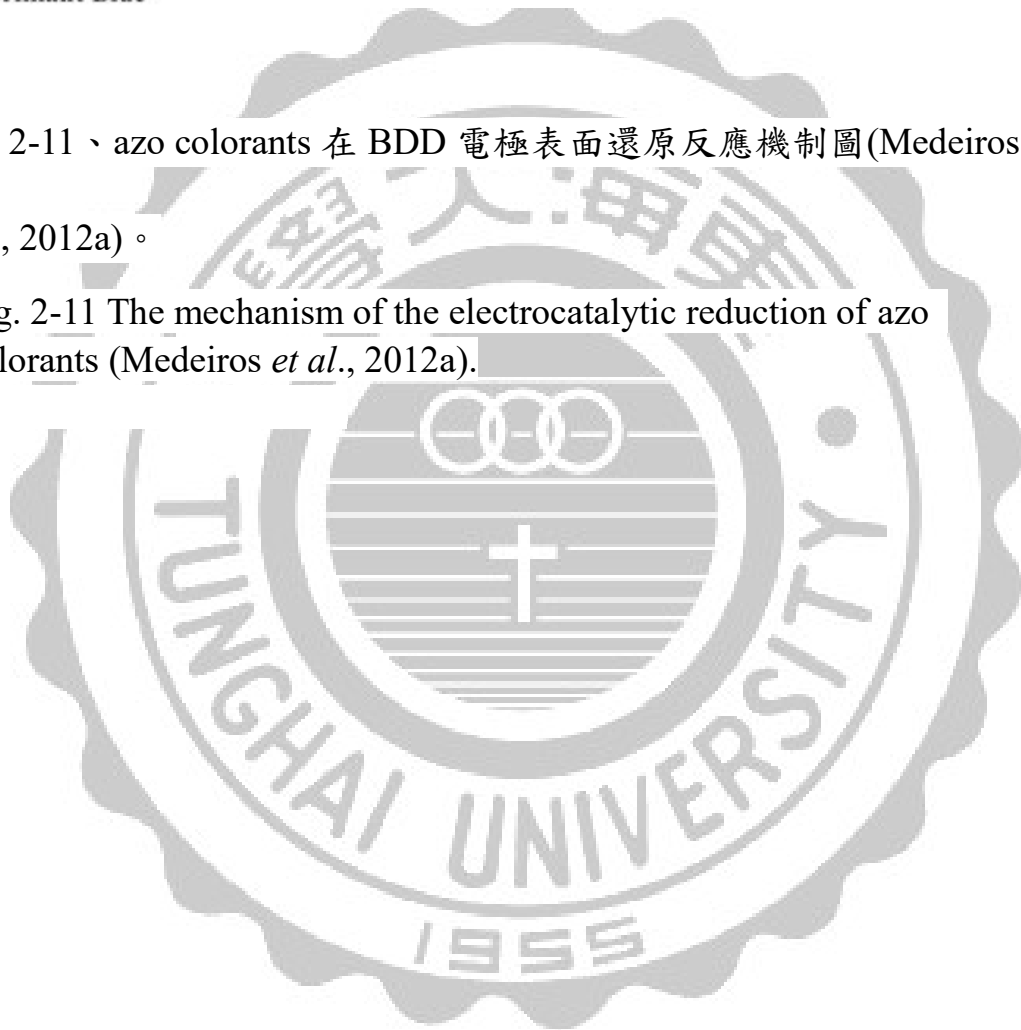
Azo Colorants



Brilliant Blue

圖 2-11、azo colorants 在 BDD 電極表面還原反應機制圖(Medeiros *et al.*, 2012a)。

Fig. 2-11 The mechanism of the electrocatalytic reduction of azo colorants (Medeiros *et al.*, 2012a).



2012 年，Ghoreishi 等人利用奈米金粒子修飾碳膠電極，檢測軟性飲料中的日落黃以及檸檬黃。其檢測的方式是將緩衝液和電極置入反應槽中，待電流訊號穩定後加入日落黃以及檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中日落黃以及檸檬黃濃度。此篇文獻奈米金是利用檸檬酸鈉還原四氯金酸而得到的。步驟分別為：將 0.5 毫升 1%檸檬酸鈉加入 50 毫升 0.01%四氯金酸中，加熱並攪拌至沸點並維持 15 分鐘，完成之後關閉加熱器，持續攪拌 15 分鐘使直徑約 24 nm 奈米金粒子生成。碳膠電極的製作步驟為：取 0.7 g 石墨加入 2 毫升製備完成的奈米金粒子水溶液混和均勻之後，加入 400 μl paraffin oil 均質後，裝填入直徑為 2 mm 的電極當中，並使用銅線當作連接碳糊的導線。文獻使用的緩衝溶液為 pH 4 的 PBS 緩衝溶液。日落黃的檢測線性範圍為 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ；檸檬黃 0.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 1.6 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ，檢測極限值為 0.03 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 以及 0.002 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Ghoreishi *et al.*, 2012)。

2013 年 Ye 等人利用 β -cyclodextrin (β -CD)、poly diallyldimethylammonium chloride (PDDA)、graphene (Gr)等材料修飾玻璃碳電極，並檢測軟性飲料中的日落黃以及檸檬黃。其檢測的方式為將緩衝液和電極置入反應槽中，待電流訊號穩定後加入日落黃以及檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電流訊號測定樣品中日落黃以及檸檬黃濃度。此文獻的修飾方式較特別，首先取 graphite oxide (GO) nanosheets 加入等重的水之後，使用超音波震盪裝置震盪一個小時，之後將 β -CD 緩慢加入並開始攪拌，此時與 PDDA 混和，完成後加入 0.2 g L-ascorbic acid (L-AA)在室溫下混合反應一個小時使 GO 還原成為 Gr 之後，以 15000 rpm 轉速離心 10 分鐘，去除水分後將黑色沉澱物置放於真空環境中乾燥。合成的反應步驟如圖 2-12 所示。進行玻璃碳電極表面修飾之前，會先將玻璃碳電極利用氧化鋁粉末進行拋光後以去離子水清洗，接著使用超音波震盪裝置震盪清除表面附著物，確認表面乾淨沒有附著物之後，再加入 1

mg β -CD-PDDA-Gr、950 μ l anhydrous alcohol、5 (wt.%) Nafion-117 50 μ l 之後使用超音波震盪裝置震盪一個小時，並取 3 μ l 修飾清潔乾淨的玻璃碳電極，乾燥後即可使用。 β -CD-PDDA-Gr 修飾後的電極表面檢測日落黃、檸檬黃氧化還原反應機制如圖 2-13。本篇文獻的反應槽溶液為 PBS 緩衝溶液。此系統的檢測線性範圍，日落黃為：0.05 μ mol l⁻¹ 到 20 μ mol l⁻¹；檸檬黃 0.05 μ mol l⁻¹ 到 20 μ mol l⁻¹，檢測極限值為 0.012 μ mol l⁻¹ 以及 0.014 μ mol l⁻¹ (Ye *et al.*, 2013)。



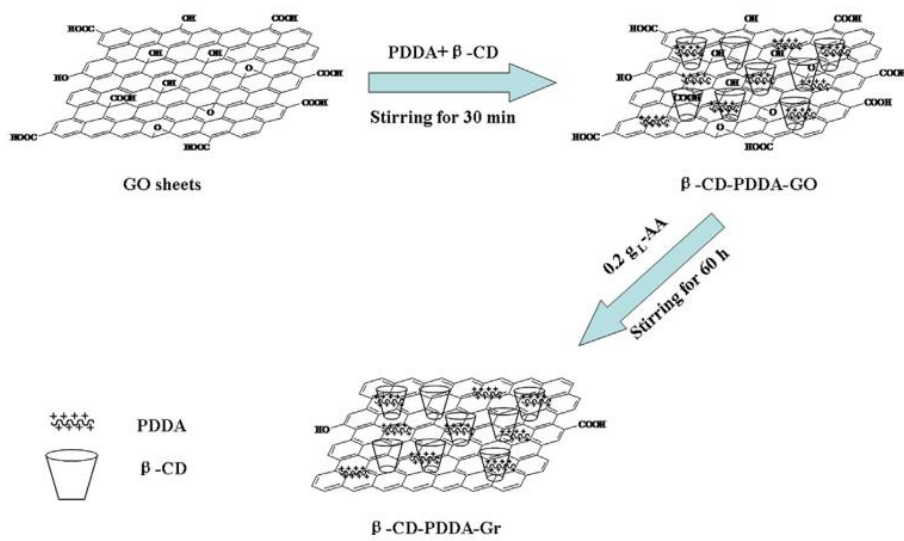


圖 2-12、 β -CD-PDDA-Gr 合成示意圖(Ye *et al.*, 2013)。

Fig. 2-12 The proposed scheme of the formation of β -CD-PDDA-Gr composite. (Ye *et al.*, 2013).

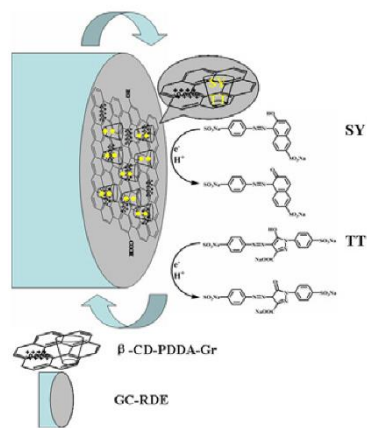


圖 2-13、日落黃、檸檬黃在 β -CD-PDDA-Gr 修飾玻璃碳電極表面
 氧化、還原示意圖(Ye *et al.*, 2013)。

Fig. 2-13 The mechanism of the electrocatalytic reaction of β -CD-PDDA-Gr modified GC electrode. (Ye *et al.*, 2013).

2013 年，Chen 等人用 alumina microfibers 修飾碳膠電極，檢測軟性飲料中的日落黃著色劑，其檢測的方式為將緩衝液和電極置入反應槽中，待電流訊號穩定後加入日落黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中日落黃濃度。文獻中使用的 alumina microfibers 為常用的合成方式。取 7 g $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ 並加入 32.5 毫升去離子水以及 15.8 g 尿素，待完全溶解後，以 autoclave 加熱至 100 並持續 24h 後，過濾並以去離子水沖洗，置放於 80°C 環境中 24 小時後，以 500°C 高溫鍛燒 2 小時。alumina microfibers 製備完成後取 0.1 g 加入 0.9 g 石墨中，再加入 0.3 毫升 paraffin oil 並均質後，將碳糊填裝入電極中，並另製沒有加入 alumina microfibers 的電極作為對照組。此文獻的緩衝溶液為 0.1 M PBS buffer (pH 6.5)。此系統的檢測線性範圍為：0.0005 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 0.1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ，檢測極限值為 0.00016 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Chen *et al.*, 2013)。

2013 年，Gan 等人利用多孔隙二氧化鈦修飾碳膠電極並檢測包含糖果、冰淇淋、汽水、果汁等七種樣品中的檸檬黃以及日落黃含量，其檢測的方式為將緩衝液和電極置入反應槽中，待電流訊號穩定後加入日落黃或檸檬黃，使其發生氧化還原反應，由氧化還原反應產生的電位及電流訊號測定樣品中日落黃濃度。文獻中使用的多孔隙二氧化鈦的製備方式大致上分為以下幾個步驟：首先將 $\text{Ti}(\text{OBU})_4$ 當作 Ti 的來源，並使用 cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 作為生成 mesopores 的模板。此時將溫度加熱至 400°C 持續 8 小時生成 TiO_2 nanoparticles。碳膠電極的製作步驟為：取 0.2 g 石墨烯、0.2 g mesoporous TiO_2 、1 g 石墨以及 0.35 毫升 paraffin oil，在充分混和均勻後形成碳糊，並將其填充在直徑為 3 mm 的電極中，完成修飾。文獻中的反應槽溶液為 0.1 M H_2SO_4 ，利用此系修飾過後的電極檢測檸檬黃、日落黃的氧化還原機制如圖 2-14 所示。此系統的檢測線性範圍日落黃為：0.02 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 2.05 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ，檢測極限值為 0.006 μ

$\mu\text{mol l}^{-1}$ ；檸檬黃的檢測線性範圍為：0.02 $\mu\text{mol l}^{-1}$ 到 1.18 $\mu\text{mol l}^{-1}$ ，
檢測極限值為 0.008 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Gan *et al.*, 2013)

。



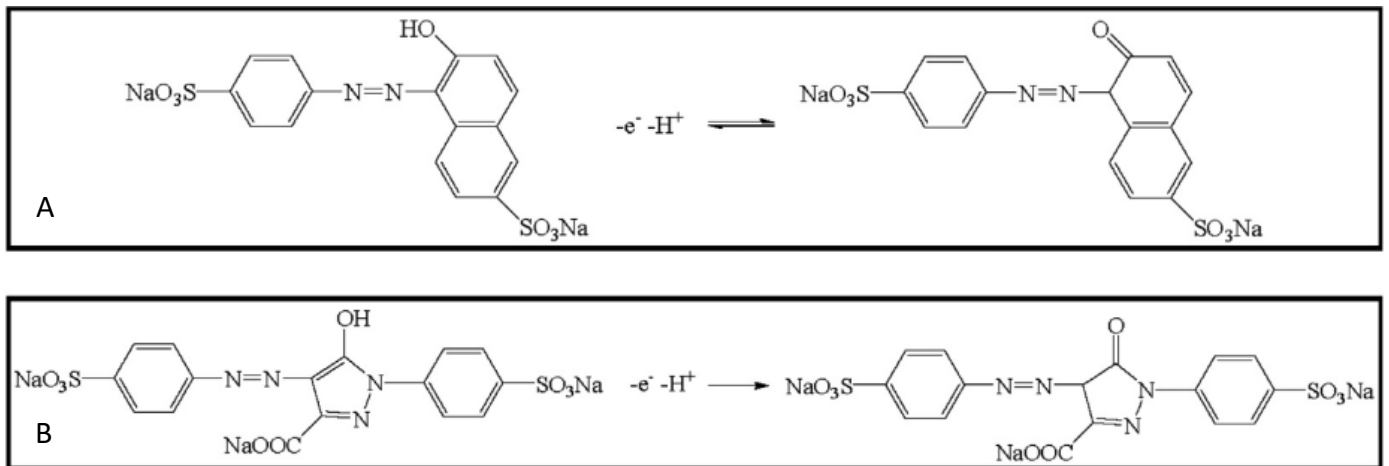


圖 2-14、檸檬黃與日落黃之氧化還原反應機制 (Gan *et al.*, 2013)。

Fig. 2-14 The mechanism of the electrocatalytic reaction of (A) sunset yellow and (B) Tartrazine (Gan *et al.*, 2013).

2015 年, Songyang 等人利用 CTAB functionalized Montmorillonite calcium (CTAB/MMT-Ca) 修飾碳膠電極之後, 檢測飲料中的日落黃含量, 其檢測的方式為將緩衝液和電極置入反應槽中, 待電流訊號穩定後加入日落黃, 使其發生氧化還原反應, 由氧化還原反應產生的電流訊號測定樣品中日落黃濃度。CTAB/MMT-Ca 的製備法為: 取 5 g MMT-Ca 以及 2.5 g CTAB 加入 50 毫升的水之後, 在室溫下攪拌混和反應 5 小時, 經由濾紙過濾後以純水清洗, 在 80 °C 溫度之下烘乾以後, 完成 CTAB/MMT-Ca 製備。碳膠電極製作步驟為: 取 0.1 g CTAB/MMT-Ca 與石墨粉混和後, 加入 0.25 毫升 paraffin oil, 充分混和均勻後形成碳糊, 並將其填充在直徑為碳膠電極中, 完成修飾。文獻中的反應槽溶液為 pH 4 acetate buffer。此系統的檢測線性範圍為: $0.0025 \mu\text{mol l}^{-1}$ 到 $0.2 \mu\text{mol l}^{-1}$, 檢測極限值為 $0.00071 \mu\text{mol l}^{-1}$ (Songyang *et al.*, 2015)。

本研究使用的修飾方式為利用氧氣電漿作為電極表面改質的工具, 電漿修飾屬於化學修飾的一種, 不同於先前文獻, 本研究的修飾方式不需要複雜的步驟, 修飾物也不須經過加熱、酸化、超音波震盪、冷卻等步驟, 可以省下電極處理的時間。氧氣電漿可以透過高能量使氧氣電離化之後, 再進行電極表面修飾, 可以改變網版印刷電極的表面特性, 使其具有較佳的親水性、較好的導電性。過去的文獻中並沒有利用氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測食品著色劑的文獻, 故本研究期望能藉由此修飾方法提升電極的檢測靈敏度以及專一性, 以建立一套更有效率的檢測系統。

表 2-5、電化學分析法於檢測食品著色劑之應用。

Table 2-5 Literatures of electrochemical methods for detecting colourants in foods.

修飾方法	線性範圍 (ppm)	來源
多壁奈米碳管/ 玻璃碳電極	SY: 0.025-5 TT: 0.2-40	Zhang <i>et al.</i> , 2009
多壁奈米碳管/ 玻璃碳電極	SY: 1.200-125 and 125-256	Song., 2010
多壁奈米碳管/ 碳膠電極	TT: 0.0534- 16.029	Ghoreishi <i>et al.</i> , 2011
參硼金剛石電 極	SY: 0.022- 1.312 TT: 0.187-4.86	Medeiros <i>et al.</i> , 2012a
參硼金剛石電 極	SY: 0.452- 22.619 TT: 2.672- 32.058	Medeiros <i>et al.</i> , 2012b
奈米金粒子/ 碳膠電極	SY: 0.045- 0.905 TT: 0.027- 0.855	Ghoreishi <i>et al.</i> , 2012
β -CD-PDDA/ 玻璃碳電極	SY: 0.027- 9.048 TT: 0.027- 10.686	Ye <i>et al.</i> , 2013
Alumina microfibers/ 碳膠電極	SY: 0.0002- 0.045	Chen <i>et al.</i> , 2013
多孔隙二氧化 鈦/碳膠電極	SY: 0.009- 0.927 TT: 0.011-0.63	Gan <i>et al.</i> , 2013
CTAB MMT-Ca/ 碳膠電極	SY: 0.001-0.09	Songyang <i>et al.</i> , 2015

第三章、材料與方法

3.1 實驗樣品

本實驗所採用之樣品皆為市售食品，分別購自台中市超市、超商以及傳統市場，樣品包含糖果、飲料、水果乾等常見加工食品。實驗樣品皆儲藏於室溫陰涼處。

3.2 實驗試藥

1. 醋酸(acetic acid, CH_3COOH) 純度 99-100%，島久藥品株式會社，日本。
2. 磷酸(phosphoric acid, H_3PO_4) 純度 85%，島久藥品株式會社，日本。
3. 硼酸(boric acid, H_3BO_3) 純度 99.5%，片山試藥株式會社，日本。
4. 乙醇(ethanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) 純度 95%，景明化工股份有限公司，台中，台灣。
5. 氯化鈉(sodium chloride, NaCl) 純度 99%，J. T. Baker，美國。
6. 磷酸氫二鈉(sodium phosphate, dibasic, anhydrous, Na_2HPO_4) 純度 99.1%，J. T. Baker，美國。

7. 甲醇(methyl alcohol, CH_3OH) 純度 99.9%，MACRON，美國。
8. 醋酸銨(Ammonium acetate, $\text{C}_2\text{H}_7\text{NO}_2$) 純度 99%，Fluca，美國。
9. 鹽酸(hydrochloric acid, HCl) 純度 35%，聯工化學廠，新竹，台灣。
10. 氫氧化鈉(sodium hydroxide, pellet, NaOH) 純度 98%，MACRON，美國。
11. 日落黃(sunset yellow FCF, $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$) 純度 >95% (HPLC)，Fluca，美國。
12. 日落黃(sunset yellow FCF, $\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$) 純度 90%，Aldrich，美國。
13. 檸檬黃(tartrazine, $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}_2$) 純度 >99% (HPLC)，Fluca，美國。
14. 檸檬黃(tartrazine, $\text{C}_{16}\text{H}_9\text{N}_4\text{Na}_3\text{O}_9\text{S}_2$) 純度 98%，Alfa Aesar，美國。

3.3 儀器設備

1. 電化學分析儀(CHI800C, CH Instruments Electrochemical Analyzer, Austin, Texas, USA)。

2. 三電極系統

網版印刷電極(SE100-MD, Zensor R&D, 禪普科技股份有限公司, 台中, 台灣)。

Ag/AgCl 電極(RE-1B, ALS, Tokyo, Japan)。

0.5 mm 白金絲電極(佳佑企業有限公司, 台北, 台灣)。

3. 電漿系統

數位式交流電源供應器(6805 Linear AC power source 0-300V /45-500Hz 500VA, 華儀電子股份有限公司, 台中, 台灣)。

油浸式變壓器(昌盛電機廠有限公司, 台中, 台灣)。

MFC Readout Power Supply(PC-540, Protec Instruments, 高雄, 台灣)。

Mass Flow Controller (5851E series, Brooks instruments, PA, USA)。

HEPA Capsule (12144,Pall Corporation, 新竹市，台灣)。

反應腔體(含放電電極)(宸昶企業有限公司，新北市，台灣)。

4. 微量吸管(Model P100、P200、P1000、P5000, Gilson Pipetman, Connecticut, USA)。

5. 完全不斷電系統(C-1000F, 伊頓飛瑞慕品股份有限公司，台中，台灣)。

6. 恆溫循環水槽(CY-130, 程揚儀器有限公司，台中，台灣)。

7. 超純水製造裝置(Barnstead EASYpure II, USA)。

8. 高效能液相層析儀(HPLC)

管柱(Luna C18, 5 μm , 250 \times 4.6 mm, Phenomenex, USA)。

幫浦(LC-10AT VP Quaternary pump, SHIMADZU, Japan)。

除氣裝置(4 channel degasser, GASTORR AG-14, Fischer analytics, Germany)。

偵測器(UV-VIS DETECTOR SPD-10A, Shimadzu, Japan)。

資料處理(Chromatocorder 21, SYSTEM INSTRUMENTS CO., LTD,

Japan)。

9. 標準型電子天平(XS 6250C, Precisa, Switzerland)。
10. 酸鹼度計(inoLab pH Level 1, 上泰儀器股份有限公司, 台中, 台灣)。
11. 電磁攪拌器(MH-1, 新光精機工業股份有限公司, 台北, 台灣)。
12. 數字型電磁攪拌器(COLOR SQUID, IKA, 詠欣有限公司, 台中, 台灣)。
13. 超音波洗淨器(5510R-DTH, 程揚儀器有限公司, 台中, 台灣)。
14. 電子分析天平(BL 120S, Sartorius, 台灣哈那精密股份有限公司, 台北, 台灣)。
15. 傅立葉轉換紅外光譜儀(Spectrum 100, PerkinElmer, USA)。

3.4 實驗架構

本研究以電化學方法檢測食品著色劑日落黃(sunset yellow, SY)以及檸檬黃(tartrazine, TT)，首先要探討最適當的檢測條件，包括氧氣電漿修飾參數、電化學條件探討、標準曲線製作、樣品及回收率檢測，最後再將樣品檢測結果與 HPLC 進行比較。詳細實驗架構如圖 3-1 所示。



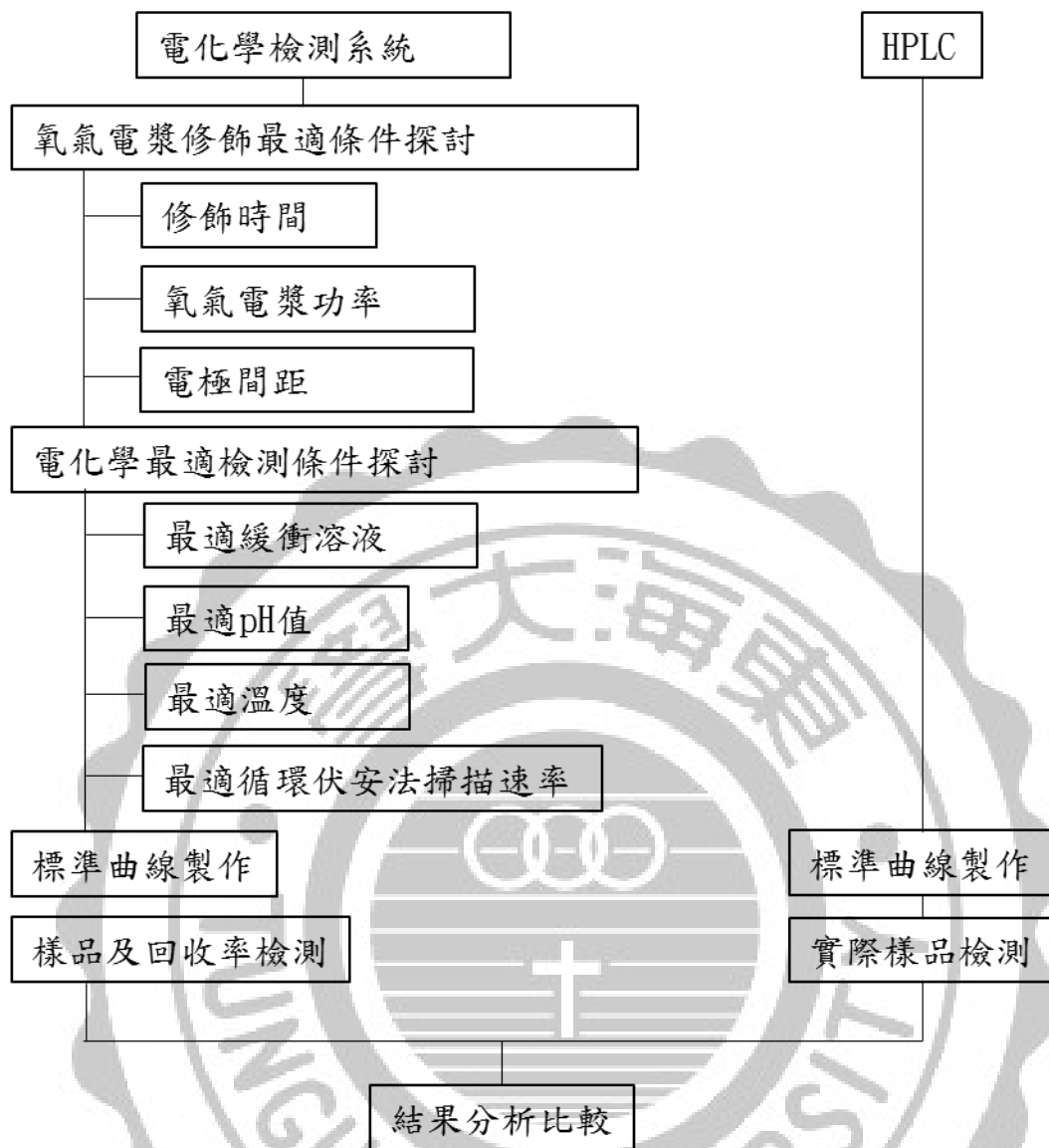


圖 3-1、本研究之實驗架構。

Fig. 3-2 Procedures for determination of food colourants in the study.

3.5 電化學檢測實驗方法

本研究應用循環伏安法檢測食品中人工著色劑，首先設定電化學分析儀的參數，包含起始電位、終點電位以及掃描速率。接著在玻璃製反應槽中加入 10 ml 緩衝溶液以及 0.1 ml 待測物，在固定溫度、pH 之下進行循環伏安掃描，當循環伏安法掃描至特定電位時，食品著色劑於電極表面失去電子發生氧化反應，並在相對應之電位顯示氧化電流訊號，接著建立電流訊號差與食品著色劑濃度之間的標準曲線，並進行定量分析。

本研究使用的電極為三電極系統，分別為工作電極網版印刷電極或氧氣電漿修飾的網版印刷電極，參考電極為銀/氯化銀(Ag/AgCl)電極，輔助電極為白金絲。檢測電流訊號的分析軟體為(CHI 800C Electrochemical Detector)，電化學設備的架構如圖 3-2 所示

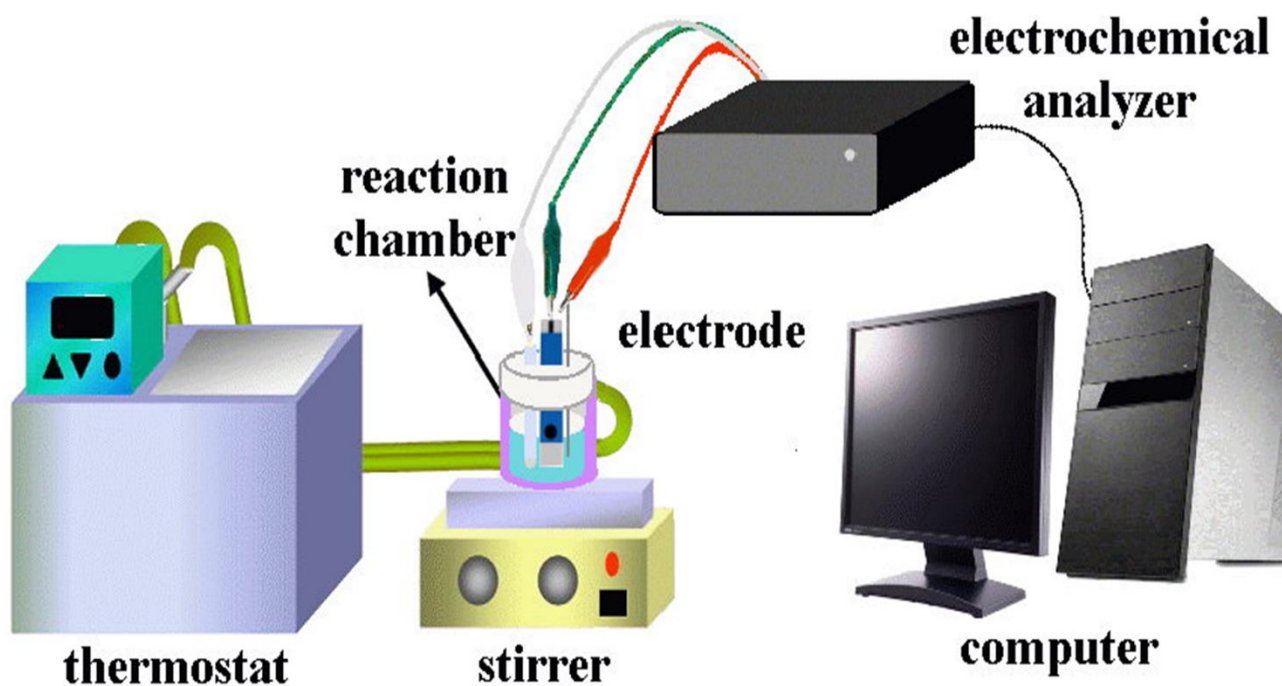


圖 3-2 電化學檢測系統示意圖。

Fig. 3-2 Schematic diagram of the electrochemical detection system.

3.6 氧氣電漿修飾網版印刷電極之方法

本研究利用氧氣電漿進行網版印刷電極表面修飾。首先將樣品放入反應腔體內，接著打開高壓鋼瓶，讓氧氣經過流速控制器之後，以 500 (cc/min) 的流量進入反應腔體中，等待約 15 分鐘讓流速穩定之後，開啟電源供應器，使電位經由變壓器增壓到設定的條件，即可使反應腔體中的氣體離子化形成電漿，再針對放在腔體中的樣品進行表面修飾。電漿系統的架構如圖 3-3 所示。



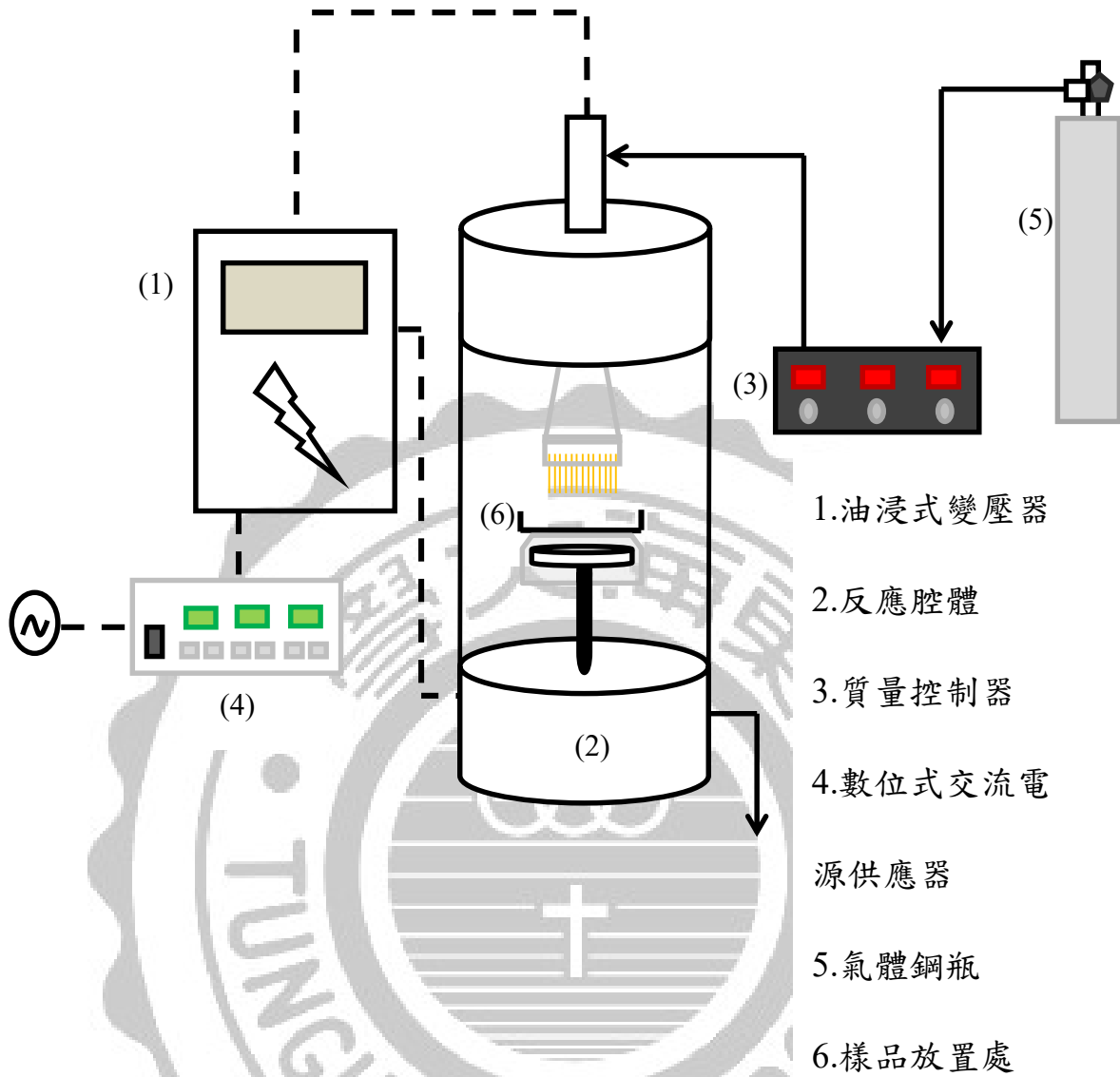


圖 3-3、電漿設備系統示意圖 (陳，2013)。

Fig.3-3 Design of plasma generating device.

3.7 氧氣電漿修飾網版印刷電極之最適條件探討

本節探討的條件包含了電漿修飾時間、電漿功率、以及電極間距三個部分進行討論。因本研究所使用的網版印刷電極為市售的拋棄式電極，故每更換一組檢測條件時即使用新的電極。

3.7.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極效應探討

本研究比較氧氣電漿修飾網版印刷電極以及未修飾市售電極檢測日落黃、檸檬黃的電流訊號差，將兩者掃描的結果利用 CHI 800C Electrochemical Detector 軟體呈現電流訊號並進行疊圖分析比較，確認此修飾方式是否可以增加電化學檢測檸檬黃、日落黃之電流訊號差。確認完成之後，進行其最適修飾條件探討。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並且取新的電極進行氧氣電漿修飾。

3.7.2 氧氣電漿修飾網版印刷電極之功率探討

本研究比較氧氣電漿修飾網版印刷電極的功率，修飾的電壓為 0 kV、10 kV、15 kV、21 kV，功率為 0 W、10.4 W、21.7 W、41.6 W。完成修飾後，利用電化學循環伏安法其檢測日落黃、檸檬黃的電流訊號差，將兩者掃描的結果利用 CHI 800C Electrochemical Detector 軟體呈現電流訊號並進行疊圖分析比較，找出最適當的氧氣電漿修飾功率。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並且取新的電極進行氧氣電漿修飾。

3.7.3 氧氣電漿修飾網版印刷電極之修飾時間探討

本研究比較氧氣電漿修飾網版印刷電極的時間，修飾的時間為 0~90 分鐘。完成修飾後，利用電化學循環伏安法其檢測日落黃、檸檬黃的電流訊號差，將兩者掃描的結果利用 CHI 800C Electrochemical Detector 軟體呈現電流訊號並進行疊圖分析比較，找出最適當的氧氣電漿修飾時間。

3.7.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極之電極間距探討

本研究比較氧氣電漿修飾網版印刷電極的電極間距，修飾的條件為 0 公分、0.5 公分、1 公分、2 公分、3 公分。完成修飾後，利用電化學循環伏安法其檢測日落黃、檸檬黃的電流訊號差，將兩者掃描的結果利用 CHI 800C Electrochemical Detector 軟體呈現電流訊號並進行疊圖分析比較，找出最適當的氧氣電漿修飾電極間距。

3.7.5 氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討

本研究比較 60 分鐘氧氣電漿修飾網版印刷電極與未修飾網版印刷電極其表面官能基變化。電極經修飾完成後，利用傅立葉轉換紅外光譜儀(Spectrum 100)，將兩者掃描的結果利用軟體進行疊圖分析比較，探討其表面變化。

3.8 電化學系統緩衝溶液對食品著色劑檢測影響之探討

在電化學系統檢測食品著色劑的文獻中，有使用過磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer solution, PBS)(Ghoreishi *et al.*, 2012)。另外，過去也有學者使用 Britton-Robinson buffer, B-R buffer (Wang *et al.*, 2014) 以及 acetate buffer(Al-Ghamdi & Kooli, 2013)等緩衝溶液進行日落黃以及檸檬黃著色劑的掃描，故本研究比較這 3 組緩衝溶液，找出最適合本系統的緩衝溶液。

於室溫 25°C 下，設定掃描電位範圍為 0.4 V ~ 1.4 V，掃描速率 0.1 V/s，分別以磷酸鹽緩衝溶液(PBS)、Britton-Robinson 緩衝溶液以及 Acetate 緩衝溶液作為反應槽溶液，PBS 緩衝溶液的配方為:分別秤取 NaCl 5.844 g 以及 Na₂HPO₄ 14.2 g，加入去離子水使其完全溶解之後，利用氫氧化鈉或鹽酸調整 pH 後，再用去離子水定量。其他的緩衝溶液如表 3-1、表 3-2 所示。緩衝溶液在調整到適當的 pH 之後，即可開始進行循環伏安法掃描。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並且取新的電極進行氧氣電漿修飾。



表 3-1、Britton-Robinson 緩衝溶液配方 (Britton & Robinson, 1931)。

Table 3-1 The formula for Britton-Robinson buffer. (Britton & Robinson, 1931).

Stocks solutions: Titration of 100 mL of a solution of 0.04 M H_3BO_3 , 0.04 H_3PO_4 and 0.04 M CH_3COOH with 0.2 N NaOH.

NaOH (mL)	pH	NaOH (mL)	pH	NaOH (mL)	pH
0.0	1.81	35.0	5.02	70.0	9.15
2.5	1.89	37.5	5.33	72.5	9.37
5.0	1.98	40.0	5.72	75.0	9.62
7.5	2.09	42.5	6.09	77.5	9.91
10.0	2.21	45.0	6.37	80.0	10.38
12.5	2.36	47.5	6.59	82.5	10.88
15.0	2.56	50.0	6.80	85.0	11.20
17.5	2.87	52.5	7.00	87.5	11.40
20.0	3.29	55.0	7.24	90.0	11.58
22.5	3.78	57.5	7.54	92.5	11.70
25.0	4.10	60.0	7.96	95.0	11.82
27.5	4.35	62.5	8.36	97.5	11.92
30.0	4.56	65.0	8.69	100.0	11.98
32.5	4.78	67.5	8.95		

表 3-2、acetate 緩衝溶液配方 (Burgess & Deutscher, 2009)。

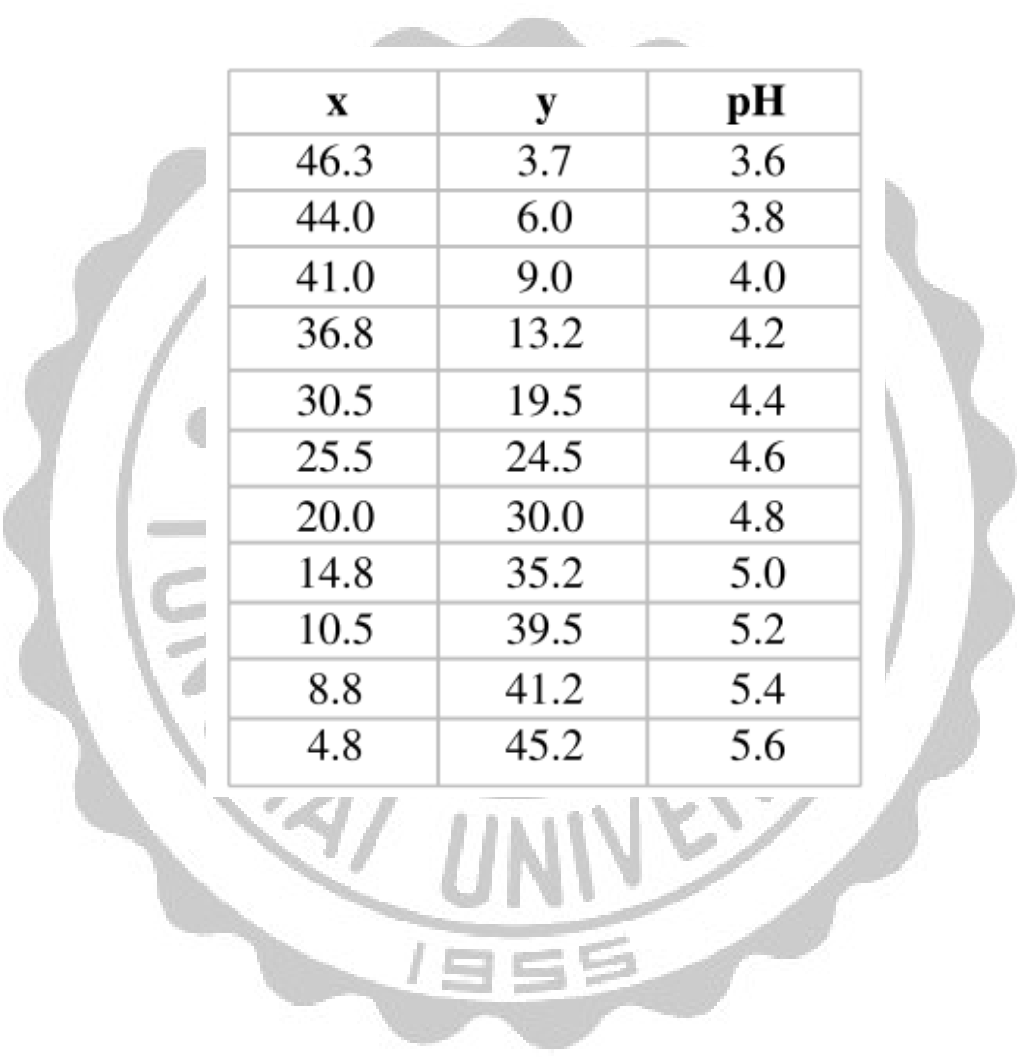
Table 3-2 The formula for acetate buffer. (Burgess & Deutscher, 2009).

Stocks solutions

A: 0.2 M solution of acetic acid (11.55 g in 1 L)

B: 0.2 M solution of sodium acetate (16.4 g $C_2H_3O_2Na$ or 27.2 g of $C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$ in 1 L).

x mL of A + y mL of B, diluted to a total of 100 mL



x	y	pH
46.3	3.7	3.6
44.0	6.0	3.8
41.0	9.0	4.0
36.8	13.2	4.2
30.5	19.5	4.4
25.5	24.5	4.6
20.0	30.0	4.8
14.8	35.2	5.0
10.5	39.5	5.2
8.8	41.2	5.4
4.8	45.2	5.6

3.8.1 電化學系統檢測食品著色劑之最適 pH 值探討

於 25°C 下，設定循環伏安法掃描電位範圍 0.4 V ~ 1.4 V，掃描速率 0.1 V/s，分別以 pH 2-10 之 PBS 作為緩衝溶液，在磁石攪拌之下加入 100 μ l，濃度為 500 ppm 的日落黃或檸檬黃，再以電化學循環伏安法進行掃描，探討 pH 與掃描電流訊號差之間的關係。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並取新的電極進行氧氣電漿修飾。

3.8.2 電化學系統檢測食品著色劑之反應槽溶液最適溫度探討

電化學系統中掃描環境的溫度變化為影響分析結果之重要變因(Shan et al., 2007)。本研究探討反應槽溶液最適溫度，以 10 mL 0.1 M 之 PBS (pH = 4.0) 為緩衝溶液，電化學循環伏安法掃描電位範圍為 0.4 V ~ 1.4 V，掃描速率為 0.1 V/s，反應槽溫度分別控制在 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C。進行檢測之前，在應槽溶液中加入 100 μ l 之檸檬黃或日落黃，利用磁石均勻混合後掃描，探討最適溫度。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並且取新的電極進行氧氣電漿修飾。

3.8.3 電化學系統檢測食品著色劑之最適掃描速率探討

在本節中利用 10 ml, 0.1 M 的 PBS (pH 4) 作為掃描的緩衝溶液，測試的環境條件為 45°C 下，設定循環伏安法的掃描電位範圍為 0.4 V 到 1.4 V，在加入檢測物利用磁石攪拌均勻之後，分別以 20 mV/s、40 mV/s、60 mV/s、80 mV/s、100 mV/s、150 mV/s、200 mV/s、250 mV/s、300 mV/s、400 mV/s 速率進行循環伏安法掃描，比較不同掃描速率之間的差異。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並取新的電極進行氧氣電漿修飾。



3.9 電化學系統檢測食品著色劑之標準曲線

利用先前探討的電化學檢測最適條件:在 45 °C 的環境之下，設定循環伏安法掃描速率為 100 mV/s，掃描的電位範圍為 0.4 V-1.4 V，緩衝溶液為濃度 0.1 M 的 PBS 緩衝溶液(pH 4)，分別在反應槽中加入不同濃度的檸檬黃或是日落黃標準溶液，以磁石混和均勻之後，以白金電極、銀/氯化銀電極以及網版印刷電極作為電化學檢測的三電極系統，針對不同濃度的標準溶液製作標準曲線。更換檢測條件時，直接丟棄使用過的電極並取新的電極進行氧氣電漿修飾。

3.10 電化學系統及 HPLC 檢測實際樣品

1. 樣品前處理

本研究選擇樣品分別購自台中市超市、超商、大賣場以及傳統市場，選擇了糖果、飲料、水果乾、肉乾等市售樣品進行檢測，樣品處理的方法參考 Gan 等人在 2013 年的方法，將樣品精確稱重後均質磨碎，並加入去離子水，由於日落黃、檸檬黃樣品都具有易溶於水的特性，所以在 45°C 水浴槽中使著色劑溶出。完成後離心去除沉澱物，以 0.22 μ m 拋棄式過濾膜過濾後將濾液定量至 10 ml，即可進行檢測。

2. 樣品檢測

樣品檢測的條件與標準品一致，將過濾完成的樣品取 100 μ l 加入反應槽中，利用磁石混和均勻之後進行檢測，並將測到的電流訊號差帶入標準曲線中，即可得到樣品中日落黃以及檸

檬黃的濃度。更換樣品時，直接丟棄使用過的電極並且取新的電極進行氧氣電漿修飾。

相同的樣品亦參考 Gan 等人在 2013 年的方法，以及公告「食品中著色劑之檢驗方法」(附錄三)以高效液相層析儀(High performance liquid chromatograph, HPLC)之分析方法檢測，並與電化學方法之分析結果進行比較。移動相為甲醇及醋酸銨，配製完成後需過孔徑 0.2 μm 的濾膜。移動相的比例為 45% 甲醇以及 55% 0.08 M 醋酸銨，流速為 1 ml/min，檢測器的波長為 417 nm，日落黃約在 3.52 分出現波峰，檸檬黃是約 2.39 分時出現，利用標準品製作標準曲線後，再將先前處理完成的樣品用相同的條件檢測，並將檢測的值帶入標準曲線中，並換算其濃度。



第四章、結果與討論

4.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極之最適條件探討

4.1.1 氧氣電漿修飾網版印刷電極效應探討

本節首先要評估的是氧氣電漿修飾網版印刷電極的效果，檢測的樣品為食品著色劑日落黃以及檸檬黃，氧氣電漿修飾的時間為 15 分鐘，電極間距 0.5 公分，探討氧氣電漿修飾網版印刷電極對於電化學循環伏安法掃描食品著色劑日落黃以及檸檬黃電流訊號效應。因先前有進行預實驗，發現著色劑檸檬黃在 pH 8 時經循環伏安法掃描的電流訊號較低，故選擇與日落黃不同的條件進行實驗分析。

掃描結果如圖 4-1 所示，檢測的樣品為日落黃，在 25°C 環境下，使用 pH 8 的磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer solution, PBS)掃描得到的結果，循環伏安法掃描的電位範圍從 0.4 V 到 0.8 V，掃描速率為每秒鐘 100 mV。在相同的濃度下，經過氧氣電漿進行表面修飾的網版印刷電極(a)大約在 0.65 V 出現了最大的氧化電流訊號，相較於沒有經過修飾氧氣電漿的網版印刷電極(b)有較高的電流訊號差值。(c)以及(d)為未加入檢測物的 PBS 掃描得到的結果。

圖 4-2 為檸檬黃經由循環伏安法掃描得到的結果，除緩衝溶液 pH 為 4、循環伏安法掃描電位範圍從 0.4 V 到 1.4 V 以外，其使用的電化學掃描條件與日落黃相同。由於先前預實驗結果發現 TT 在緩衝溶液 pH 8 產生的氧化反應電流訊號較不明顯，故依照預實驗結果選擇 pH 4。圖(a)為經過氧氣電漿進行表面修飾的網版印刷電極掃描濃度 500 ppm 檸檬黃的結果，其在 1.03 V 左右的電位產生了最大的電流訊號，(b)為市售網版印刷電極在未經修飾直接掃描 500 ppm 檸檬黃的結果，兩組電極掃描得到的最大氧化電流訊號扣掉未加入檢測物

時掃描磷酸鹽緩衝溶液所得到的電流訊號(c)、(d)之後，即為檢測的大電流訊號差。由掃描的結果可以得知，在循環伏安法掃描的過程當中，氧化反應所產生的電流訊號差較還原反應的電流訊號差明顯。故在本研究中選擇以氧化反應的電流訊號差作為實驗探討依據。

綜合以上兩種食品著色劑的掃描結果可以發現，經氧氣電漿修飾後的網版印刷電極相較於未修飾的裸電極可以提高檢測食品著色劑日落黃 38%以及檸檬黃約 45%的電流訊號。



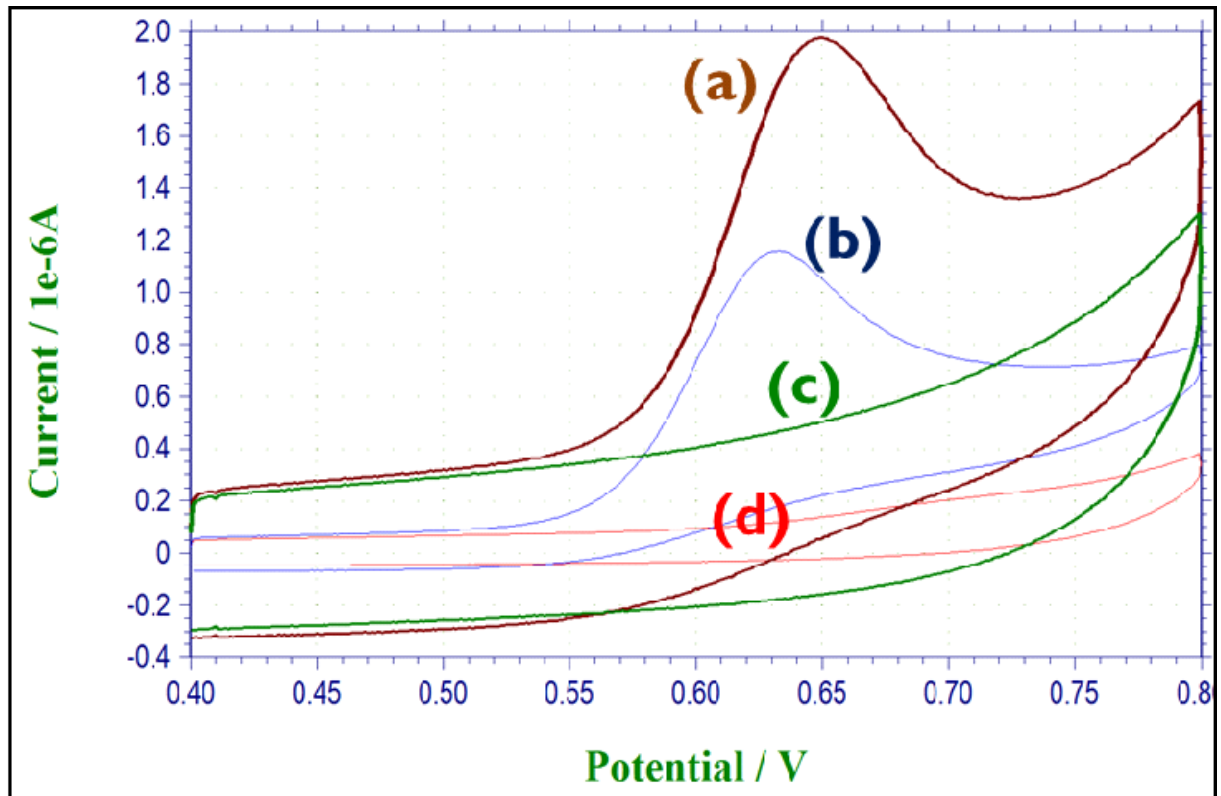


圖 4-1、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測日落黃之效應探討，(a) 以氧氣電漿修飾網版印刷電極掃描添加日落黃之緩衝溶液；(b) 網版印刷電極掃描添加日落黃之緩衝溶液；(c) 以氧氣電漿修飾網版印刷電極掃描緩衝溶液；(d) 網版印刷電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-1 Electrochemical behaviours of SPCE after oxygen plasma surface modification. CV responses of the SPCE after oxygen plasma surface modification in a 0.1 M PBS (pH 8.0) buffer at 25°C. (a) oxygen plasma modified SPCE + 500 ppm SY, (b) bare SPCE + 500 ppm SY, (c) oxygen plasma modified SPCE, (d) bare SPCE. Scan rate = 0.1 V/s.

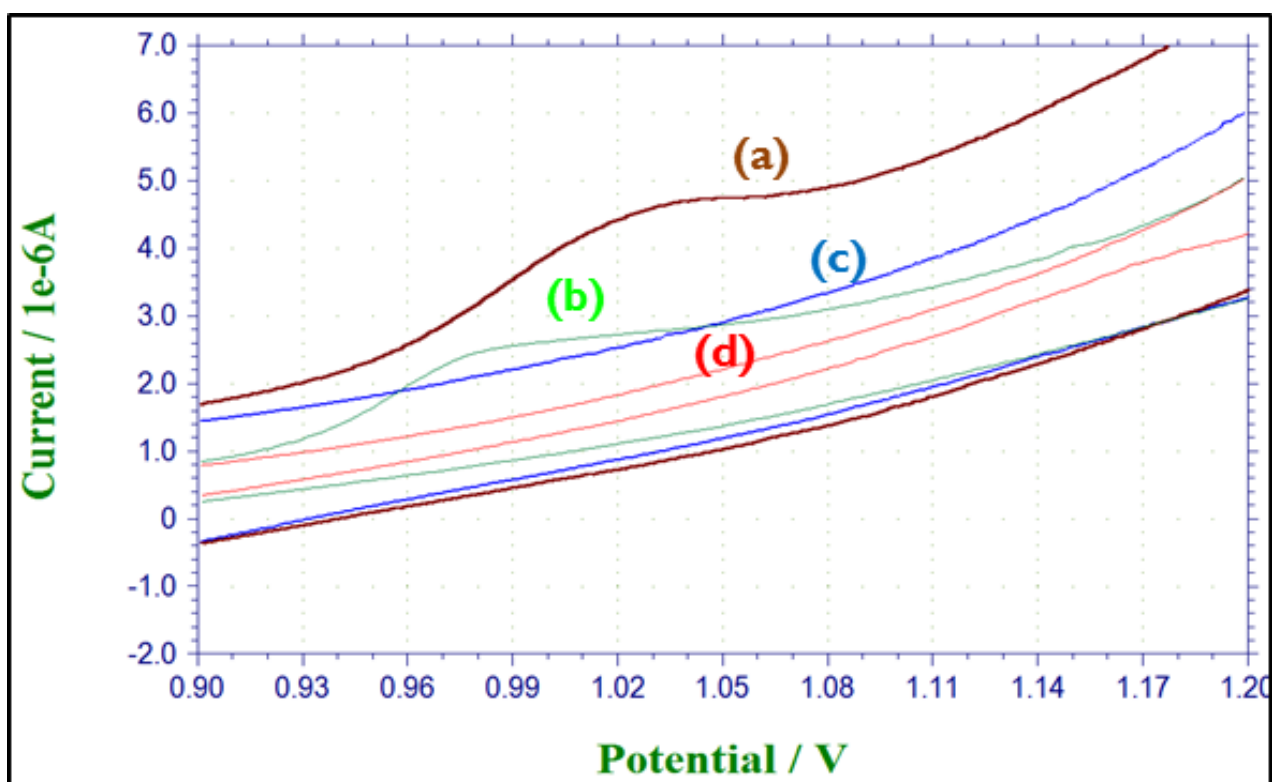


圖 4-2、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測檸檬黃之效應探討，(a) 以氧氣電漿修飾網版印刷電極掃描添加檸檬黃之緩衝溶液；(b) 網版印刷電極掃描添加檸檬黃之緩衝溶液；(c) 以氧氣電漿修飾網版印刷電極掃描緩衝溶液；(d) 網版印刷電極掃描緩衝溶液。

Fig. 4-2 Electrochemical behaviours of SPCE after oxygen plasma surface modification. CV responses of the SPCE after oxygen plasma surface modification in a 0.1 M PBS (pH 4.0) buffer at 25°C. (a) oxygen plasma modified SPCE + 500 ppm TT, (b) bare SPCE + 500 ppm TT, (c) oxygen plasma modified SPCE, (d) bare SPCE. Scan rate = 0.1 V/s.

4.1.2 氧氣電漿修飾網版印刷電極之功率探討

電漿修飾的過程當中，依據歐姆定律(Ohm's law)推導的 $\frac{V^2}{R}=P$ 公式可得知 V^2 與 P 成正相關。其中 V 為電壓、 R 為電阻、 P 為瞬時功率，故當電阻固定，電位提升時，其功率也會增加，氧氣電漿會有較高的能量進行網版印刷電極的表面修飾。

在此探討氧氣電漿修飾網版印刷電極的電位在 0 kV、10 kV、15 kV、21 kV 之間的變化，氣體流量為 500 (cc/min)，實驗結果如圖 4-3 所示，檢測物濃度為 500 ppm 日落黃掃描結果，日落黃掃描的順序分別為氧氣電漿修飾的功率依序為(a) 21 kV、(b) 15 kV、(c) 10 kV 以及 (d) 0 kV；結果可以發現符合先前提到的現象，在電壓越高的情況之下功率也跟著提高，故可以針對日落黃測得較高的電流訊號差。

圖 4-4 為檸檬黃的檢測結果，(A)為循環伏安法掃描電位範圍從 0.4 V 到 1.4 V 得到的結果。(B)為(A)電位範圍從 0.94 V 到 1.14 V 放大的結果。在本研究中，網版印刷電極利用氧氣電漿修飾的電位分別為，(a) 15 kV、(b) 21 kV、(c) 10 kV 以及(d) 0 kV，檸檬黃的電流訊號差值呈現與日落黃類似的趨勢，檸檬黃掃描的順序分別為當電壓為 10 kV 時，電漿輸出功率為 10.4 W；15 kV 時為 21.7 W；當電壓增加至 21 kV 時，功率增加至 41.6 W。

由結果得知，在檸檬黃與日落黃濃度為 500 ppm 之下，越高的電壓修飾的網版印刷電極所得到的電流訊號越高，故選擇本研究設備所能承受的最高上限 21 kV 作為氧氣電漿修飾電壓參數的依據。

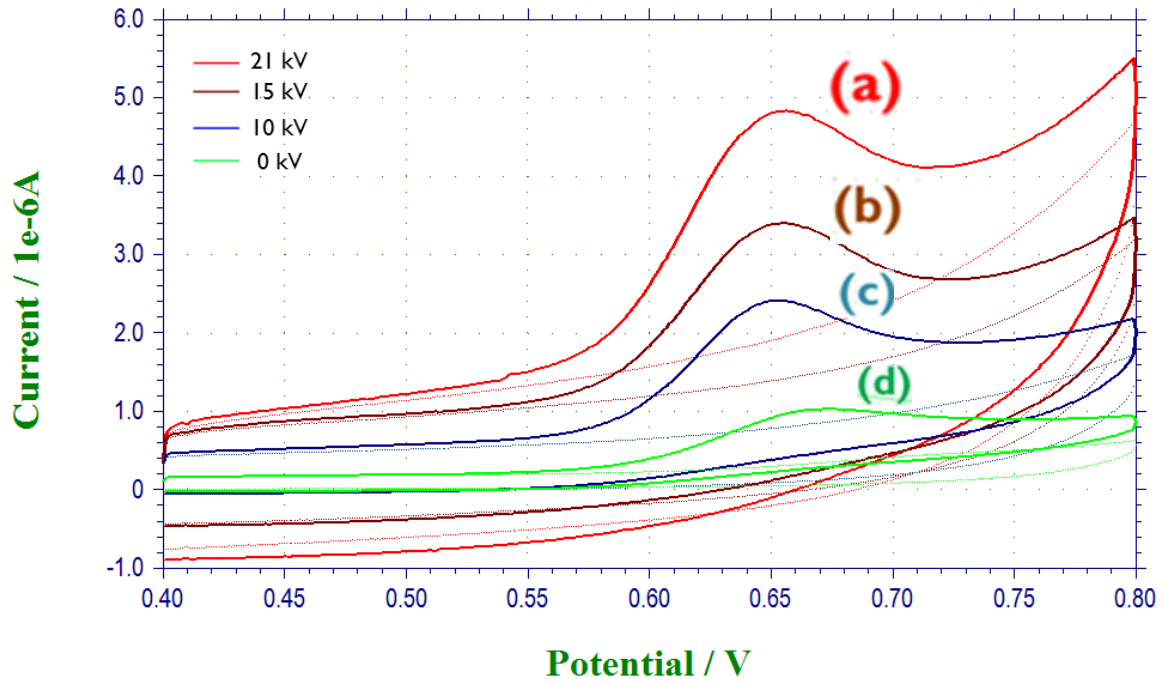


圖 4-3、氧氣電漿修飾網版印刷電極對檢測日落黃電流訊號之電壓探討。(a) 21 kV；(b) 15 kV；(c) 10 kV；(d) 0 kV。

Fig.4-3 Effect of the plasma intensity on the oxidation peak current for determination of SY. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 8.0) with 500 ppm sunset yellow at 25°C. Plasma intensity was: (a) 21 kV, (b) 15 kV, (c) 10 kV, (d) 0 kV. Scan rate = 0.1 V/s.

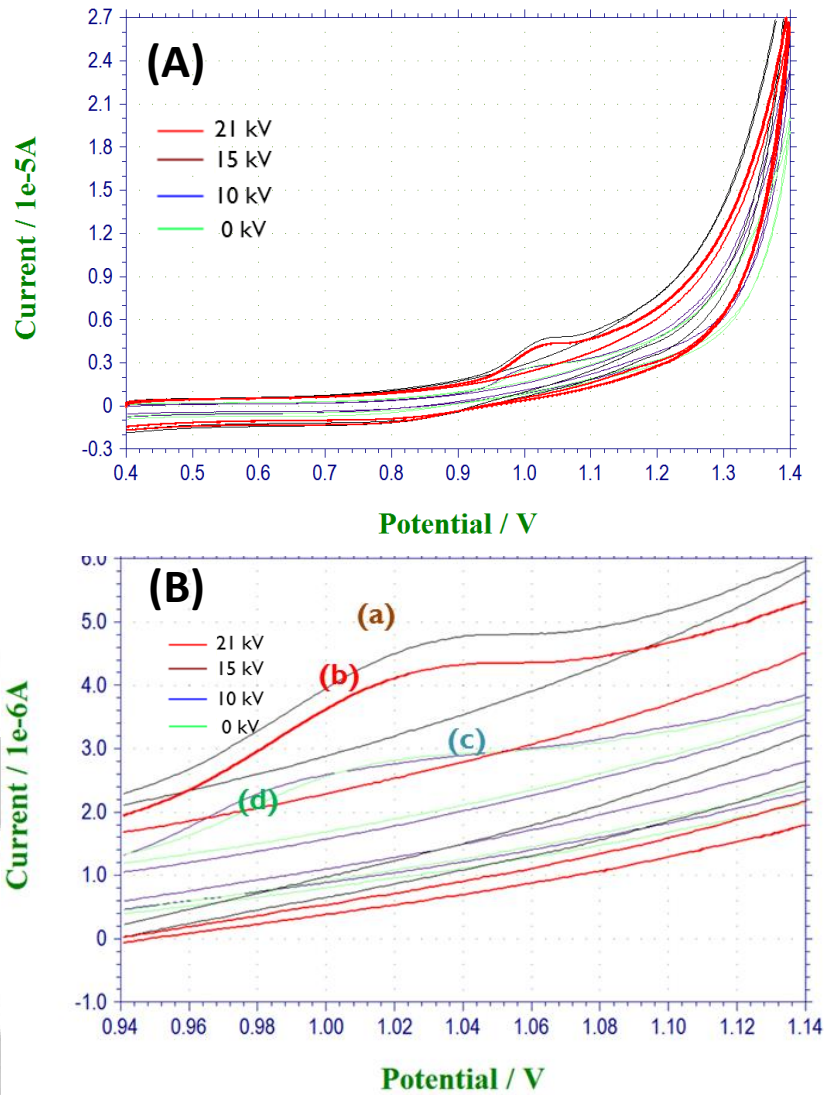


圖 4-4、氧氣電漿修飾網版印刷電極對檢測檸檬黃電流訊號之電壓探討。(A) 電極經 (a) 15 kV；(b) 21 kV；(c) 10 kV；(d) 0 kV 修飾後檢測檸檬黃之電流訊號反應圖。(B) 循環伏安法電位範圍 0.94 V~1.14 V 放大檢視圖。

Fig.4-4 (A) Effect of the plasma intensity on the oxidation peak current for determination of TT. (B) Magnify the figure 4-4 between potential 0.94 to 1.14 V to see TT peak. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 4.0) with 500 ppm sunset yellow at 25°C. Plasma intensity was: (a) 15 kV, (b) 21 kV, (c) 10 kV, (d) 0 kV. Scan rate = 0.1 V/s.

4.1.3 氧氣電漿修飾網版印刷電極之修飾時間探討

本節探討電極修飾時間對於循環伏安法掃描日落黃、檸檬黃的效應。電極修飾的時間從 0 到 90 分鐘，電壓為 21 kV，電極間距為 0.5 公分。將循環伏安法的掃描結果整合，結果如圖 4-5。由結果可以發現，當日落黃濃度 500 ppm 時，未經過修飾的電極(0 分鐘)所得到的電流訊號較低，隨著修飾的時間增加，電流訊號也增加，到 60 分鐘時得到的訊號較高，超過 60 分鐘之後訊號又開始下降，日落黃所得到的檢測電流訊號在氧氣電漿修飾時間為 60 分鐘。

檸檬黃的部分如圖 4-6，與日落黃相同條件之下進行掃描，氧氣電漿修飾時間為 0 到 90 分鐘，得到的結果與日落黃類似。氧氣電漿修飾時間在 30 分鐘以內並沒有明顯的差異，30 分鐘後循環伏安法的電流訊號上升，到 60 分鐘時出現最高訊號，但是過了 60 分鐘之後即開始下降，在此推測可能的原因是粒子轟擊在網版印刷電極表面產生蝕刻的現象，其鍵結結構受影響(蕭，2004)，過久的修飾蝕刻現象可能會使網版印刷電極的表面結構不穩定，而使電流訊號下降。

綜觀以上兩組人工著色劑的檢測結果，經由氧氣電漿修飾 60 分鐘後的網版印刷電極，在循環伏安法掃描的電流訊號差最高，故以 60 分鐘做為最適修飾條件。

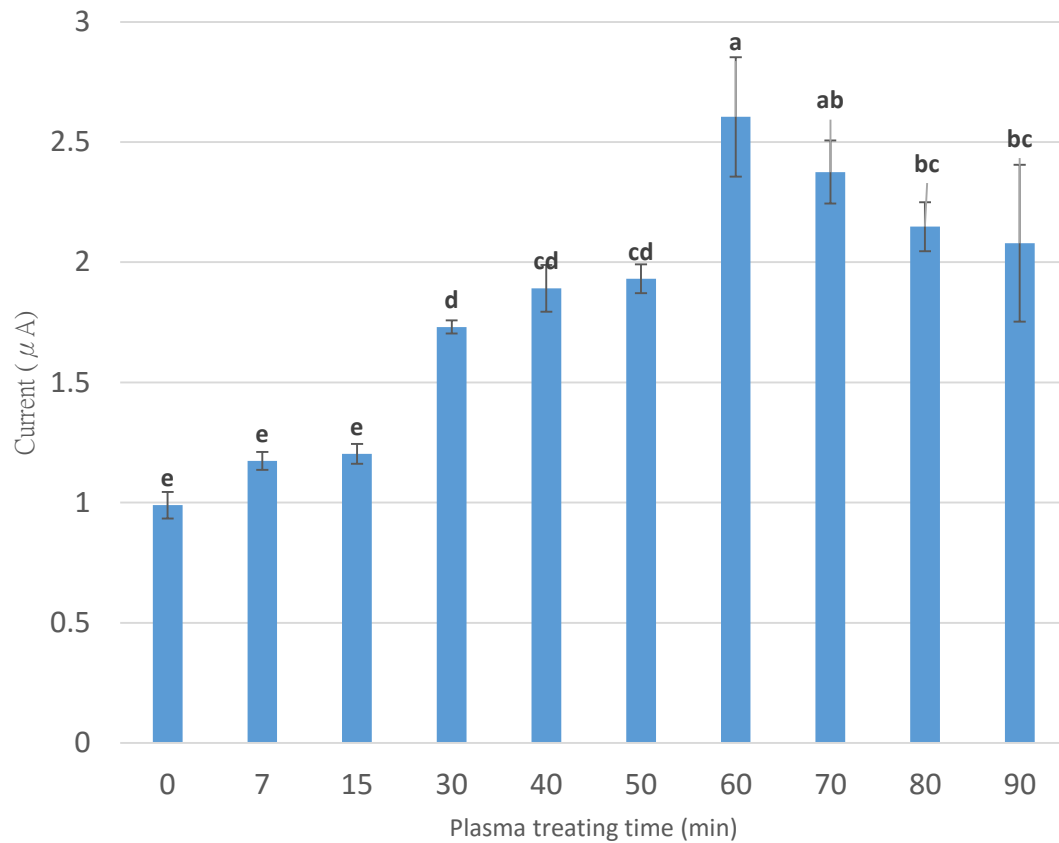


圖 4-5、氧氣電漿修飾網版印刷電極修飾時間對檢測日落黃電流訊號反應之影響。

Fig.4-5 Effect of the oxygen plasma treating time on the oxidation peak current for determination of SY. Oxygen plasma intensity was set for 21 kV. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 8.0) with 500 ppm sunset yellow at 25°C. Scan rate = 0.1 V/s.

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different oxygen plasma treating time.

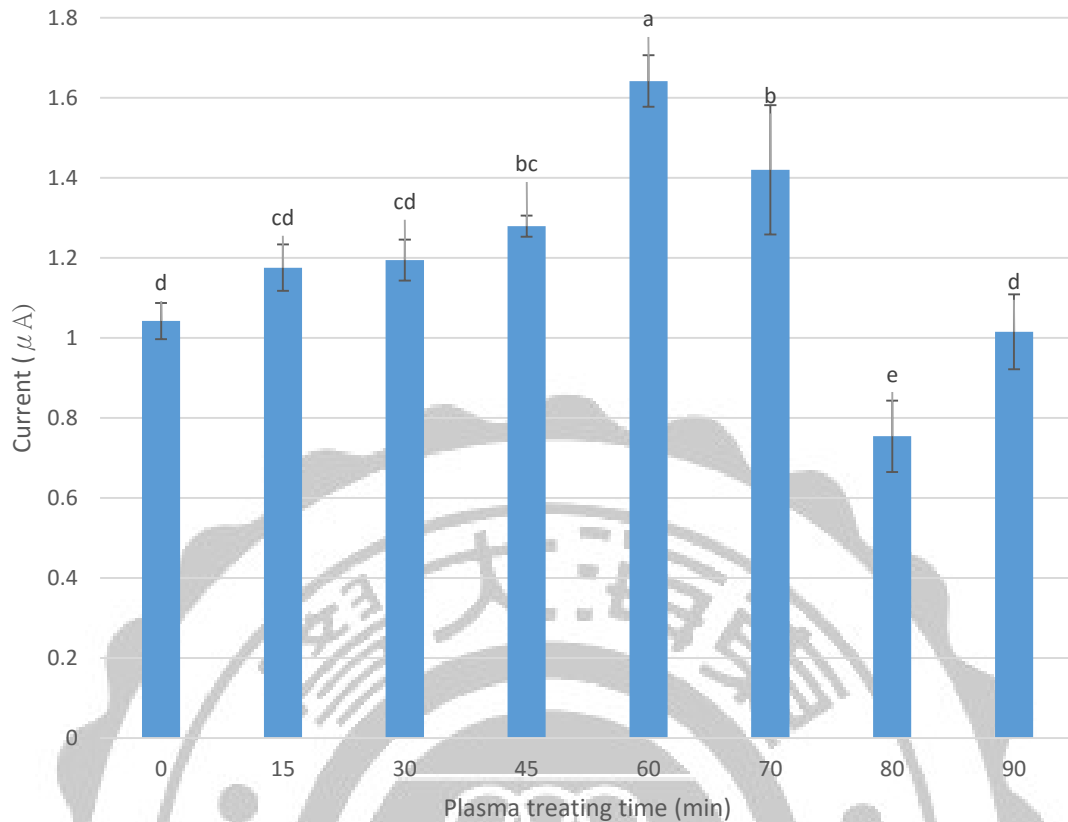


圖 4-6、氧氣電漿修飾網版印刷電極修飾時間對檢測檸檬黃電流訊號反應之影響。

Fig.4-6 Effect of the oxygen plasma treating time on the oxidation peak current for determination of TT. Oxygen plasma intensity was set for 21 kV. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 4.0) with 500 ppm tartrazine at 25°C. Scan rate = 0.1 V/s.

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different oxygen plasma treating time.

4.1.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極之電極間距探討

在氧氣電漿修飾過程中，當電極的間距縮短時，電漿的密度會提高。本研究中所測試的電漿修飾電極間距從 0.5 公分到 3 公分，修飾後之電極用以檢測日落黃的結果如圖 4-7 所示，(a)、(b)、(c)、(d) 分別是 0.5、1、2、3 公分的電極間距以及(e)未修飾(控制組)，所得到的電流訊號差分別為 $2.56 \mu A$ 、 $1.87 \mu A$ 、 $1.53 \mu A$ 、 $1.21 \mu A$ ，控制組平均為 $0.99 \mu A$ 。由結果得知，在實驗設定的範圍中，電極間距越短所得到的電流訊號越高。

在相同的條件之下，檸檬黃檢測出來的結果如圖 4-8 所示，經循環伏安法掃描 500 ppm 檸檬黃，與 pH 4 的 PBS 緩衝溶液相差的電流訊號值從(a)、(b)、(c)、(d)、(e)分別是 0.5、1、2、3 公分以及(e)未修飾(control)，所得到的電流訊號差分別為 $0.72 \mu A$ 、 $0.61 \mu A$ 、 $0.52 \mu A$ 、 $0.48 \mu A$ ，control 組平均為 $0.41 \mu A$ 。

綜合這兩組的結果，都有符合先前的預期，在越低的電極間距下會出現較高的電流訊號差。推測是較小的電極間距所產生的電漿密度高，因此在相同的環境條件之下會有比較高的能量修飾網版印刷電極，在氧氣電漿修飾的過程中，自由電子對待修飾電極表面進行轟擊，使其結構發生改變，讓含氧的官能基(如 C-O、C=O 及 -COO 等)增加，會增加其表面的電荷，此外，修飾電極表面的性質也會發生變化，由疏水性轉變為親水性，故在電極間距低的情況下，氧氣電漿密度高，可以用較高的能量修飾電極，得到較高的檢測電流訊號差。日落黃的部分電極間距為 3 cm、2 cm、1 cm、0.5 cm，4 個組別與控制組平均的差距分別為 18%、35%、47%、61%；檸檬黃與控制組平均的差距分別為 6%、35%、36%、50%，故在此選擇 0.5 公分做為氧氣電漿修飾電極的條件依據。

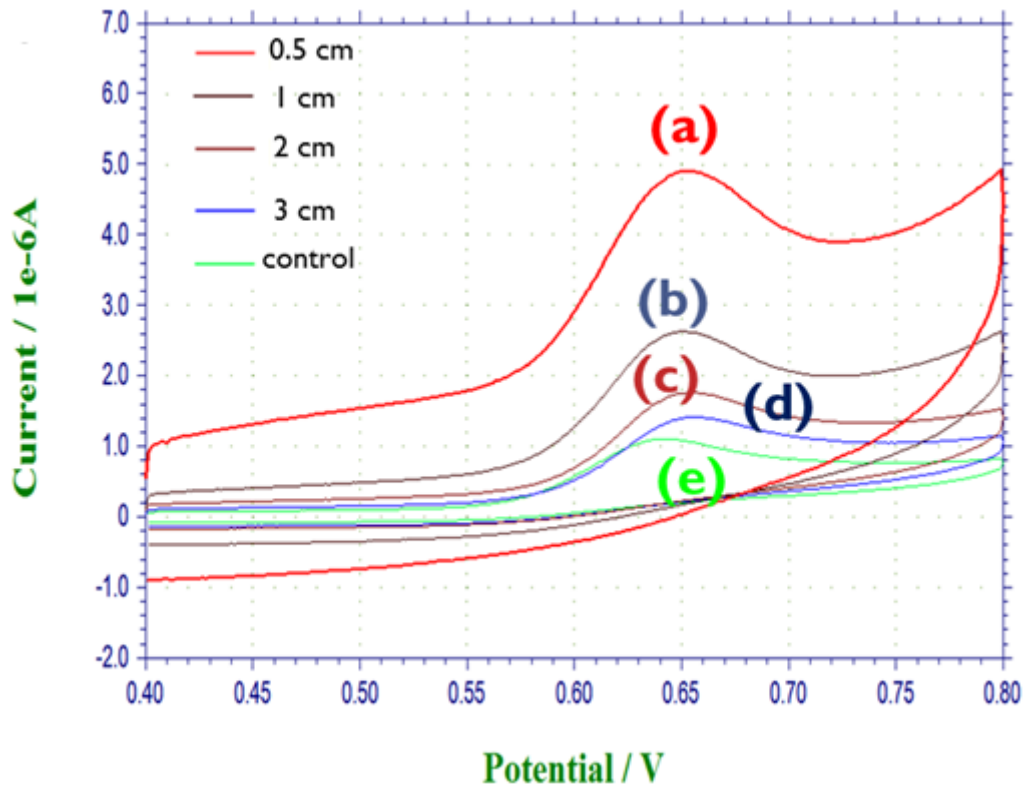


圖 4-7、氧氣電漿修飾網版印刷電極過程中電極間距探討圖對日落黃檢測之影響，電極間距(a) 0.5 cm； (b) 1 cm；(c) 2 cm；(d) 3 cm；(e) 控制組。

Fig.4-7 Effect of the oxygen plasma electrode spacing on the oxidation peak current for determination of SY. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. Plasma intensity was 21 V. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 8.0) with 500 ppm sunset yellow at 25 °C. The electrode spacing of oxygen plasma modification was: (a) 0.5 cm, (b) 1 cm, (c) 2 cm, (d) 3 cm, (e) control. Scan rate = 0.1 V/s.

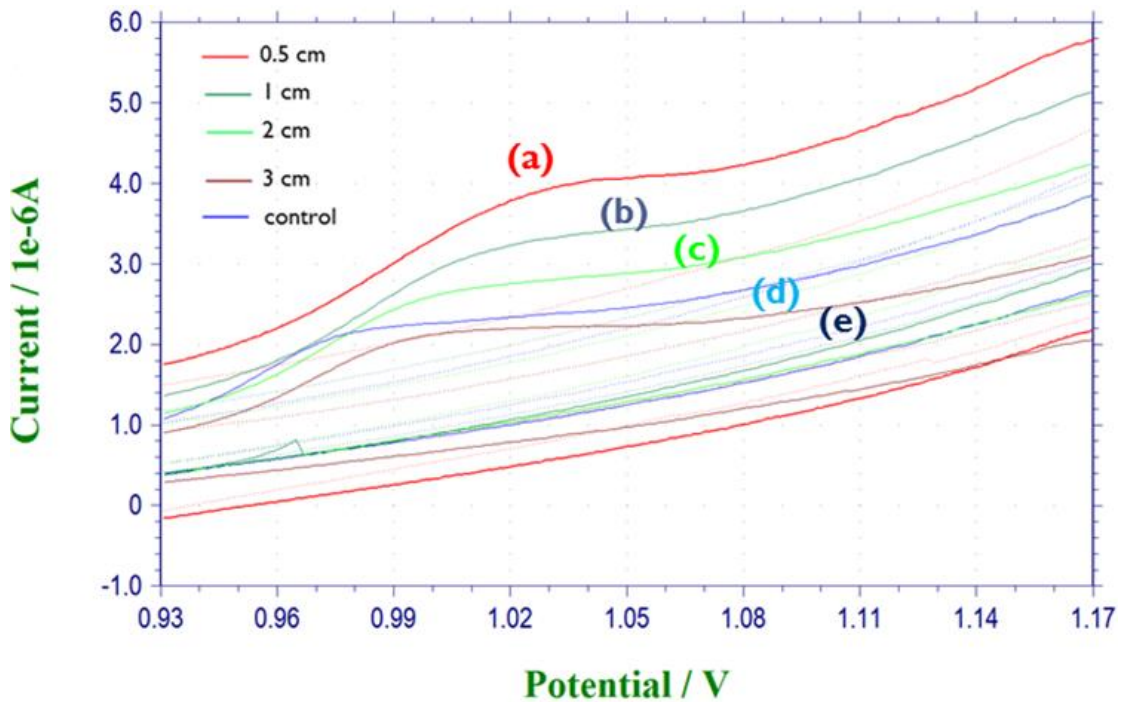


圖 4-8、氧氣電漿修飾網版印刷電極過程中電極間距探討圖對檸檬黃檢測之影響，電極間距(a) 0.5 cm； (b) 1 cm；(c) 2 cm；(d) 3 cm；(e) 控制組。

Fig.4-8 Effect of the oxygen plasma on the oxidation peak current for determination of TT. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. Plasma intensity was 21 kV. CV responses obtained through 0.1 M PBS (pH 4.0) with 500 ppm tartrazine at 25°C. The electrode spacing of oxygen plasma modification was: (a) 0.5 cm, (b) 1 cm, (c) 2 cm, (d) 3 cm, (e) control. Scan rate = 0.1 V/s.

4.1.5 氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討

在氧氣電漿修飾過程中，會在碳的表面產生當含有氧的官能基團 (Cascarini *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 1996)。本研究使用的氧氣電漿修飾時間為 60 分鐘，電極間距為 0.5 cm，電壓為 21 kV。故探討在此修飾條件下，其表面含氧官能基團差異。

圖 4-9 為網版印刷電極經傅立葉轉換紅外光譜儀掃描後得到的結果，其中黑色曲線為沒有經過氧氣電漿修飾，紅色的曲線為 60 分鐘氧氣電漿表面修飾的結果。在波數 1710 cm^{-1} 的位置有波峰產生，此位置的官能基團為 carbonyl group (C=O)，代表在氧氣電漿修飾的過程中，自由電子對待修飾電極表面進行轟擊，使其結構發生改變，讓含氧的官能基團增加，與先前文獻的論述一致。



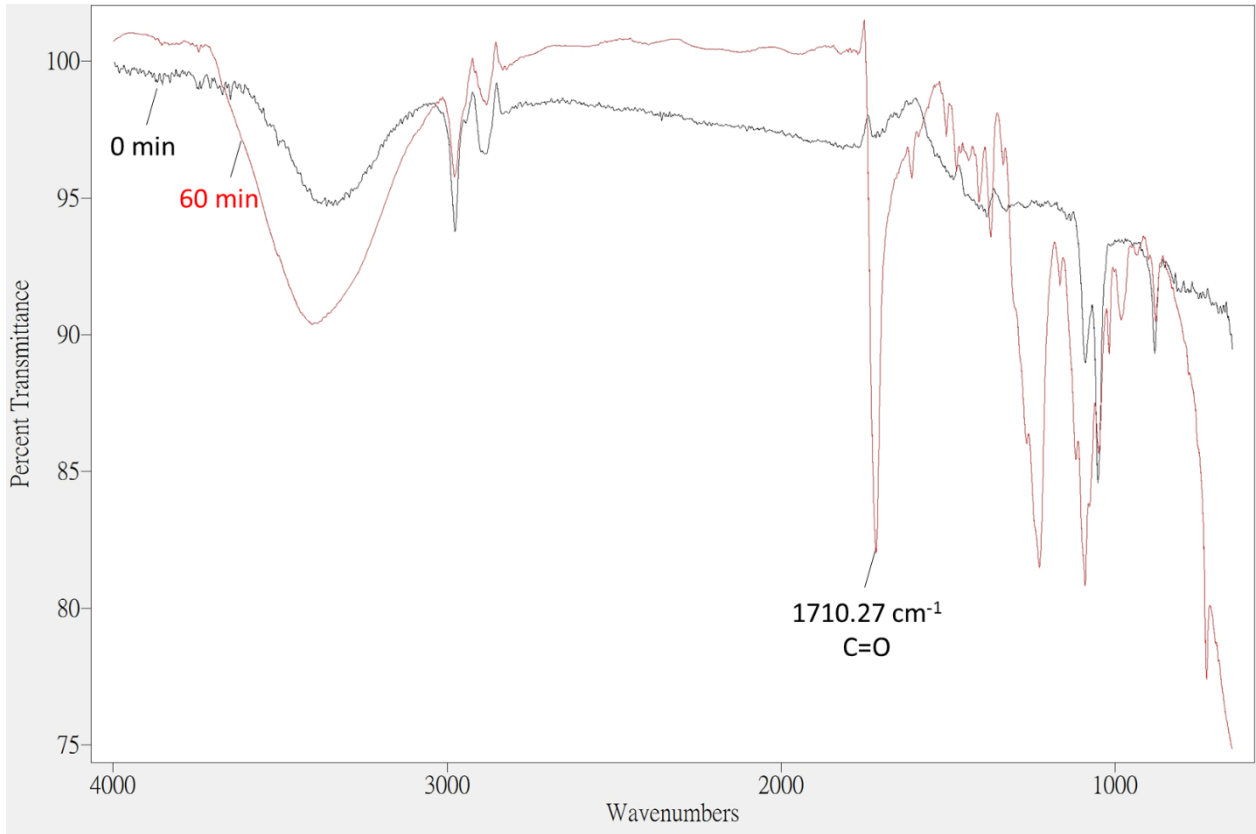


圖 4-9、氧氣電漿修飾網版印刷電極之表面官能基探討。

Fig.4-9 Effect of the oxygen plasma treatment on the formation of oxygenated functionalities of SPCE.

4.2 電化學系統緩衝溶液對食品著色劑檢測影響之探討

在電化學系統檢測食品著色劑的文獻中，有使用過磷酸鹽緩衝溶液(phosphate buffer solution, PBS)(Ghoreishi *et al.*, 2012)。另外，過去也有學者使用 Britton-Robinson buffer, B-R buffer (Wang *et al.*, 2014) 以及 acetate buffer(Al-Ghamdi & Kooli, 2013)等緩衝溶液進行日落黃以及檸檬黃著色劑的掃描，故本研究比較這 3 組緩衝溶液，找出最適合本系統的緩衝溶液。

在電化學反應槽中加入 10 ml 緩衝溶液之後，加入濃度為 500 ppm 之日落黃或檸檬黃 100 μ l，利用磁石攪拌均勻之後，再將反應槽放入水域槽中，待溫度穩定之後，開始用循環伏安法掃描反應電流。圖 4-10 為 PBS buffer、B-R buffer、acetate buffer 3 種緩衝溶液經循環伏安法掃描 500 ppm 日落黃的結果。(a)以及(b)為 PBS 緩衝溶液掃描時的結果；(c)以及(d)為 acetate buffer；(e)以及(f)為 B-R buffer。(a)、(c)、(e)為加入 500 ppm 日落黃標準品的緩衝溶液；(b)、(d)、(f)為只有緩衝溶液在相同條件之下掃描的空白對照組。其檢測的環境是在溫度 25 $^{\circ}$ C、循環伏安法掃描速率 100 mV/s 的條件之下掃描出來的結果。3 組緩衝溶液皆在約 0.76V 的電位產生最大電流訊號。PBS 經循環伏安法掃描得到的波峰(a)扣除背景值(b)後所得到的反應電流平均值為 2.239 μ A；acetate buffer 經循環伏安法掃描得到的波峰(c)扣除背景值(d)後所得到的反應電流平均值為 1.941 μ A；B-R 經循環伏安法掃描得到的波峰(e)扣除背景值(f)後所得到的反應電流平均值為 1.38 μ A。在檢測日落黃的部分，PBS 有較高的電流訊號。

圖 4-11 為 500 ppm 檸檬黃在溫度 25 $^{\circ}$ C、循環伏安法掃描速率 100 mV/s 的條件之下掃描出來的結果。利用電化學循環伏安法掃描的結果，PBS 經循環伏安法掃描得到的波峰(a)扣除背景值(b)後所得到的反應電流平均值為 1.76 μ A；acetate buffer 經循環伏安法掃描得

到的波峰(c)扣除背景值(d)後所得到的反應電流平均值為 $0.972 \mu\text{A}$ ；
B-R buffer 經循環伏安法掃描得到的波峰(e)扣除背景值(f)後所得到的反應電流平均值為 $1.162\mu\text{A}$ ，綜合兩組著色劑的結果選擇 PBS 作為實驗的緩衝溶液。



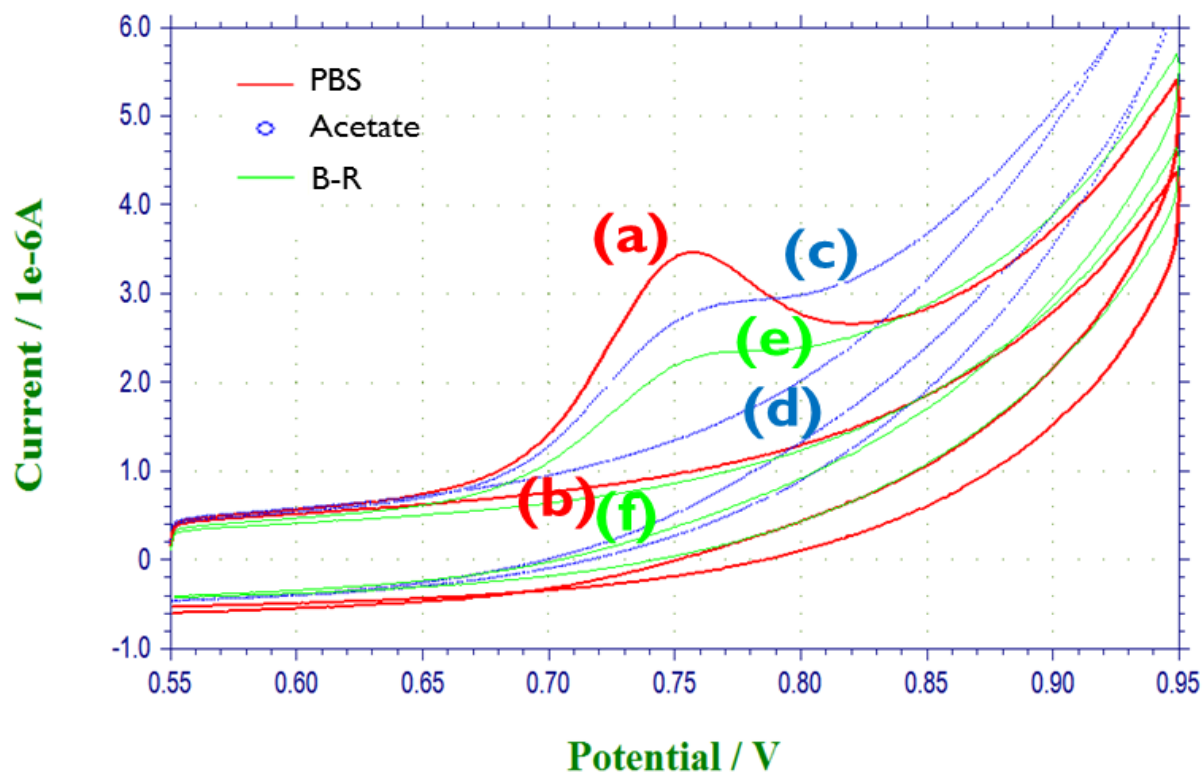


圖 4-10、電化學系統之緩衝溶液對日落黃檢測影響探討，(a) PBS with 500 ppm SY；(b) PBS；(c) acetate buffer with 500 ppm SY；(d) acetate buffer；(e) B-R buffer with 500 ppm SY；(f) B-R buffer。

Fig.4-10 Effect of the different electrolytes on the oxidation peak current for determination of SY. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. Plasma intensity was 21 kV. The electrode spacing of oxygen plasma modification was 0.5 cm. CV responses obtained through (a) PBS with 500 ppm SY, (b) PBS, (c) acetate buffer with 500 ppm SY, (d) acetate buffer, (e) B-R buffer with 500 ppm SY, (f) B-R buffer. Scan rate = 0.1 V/s.

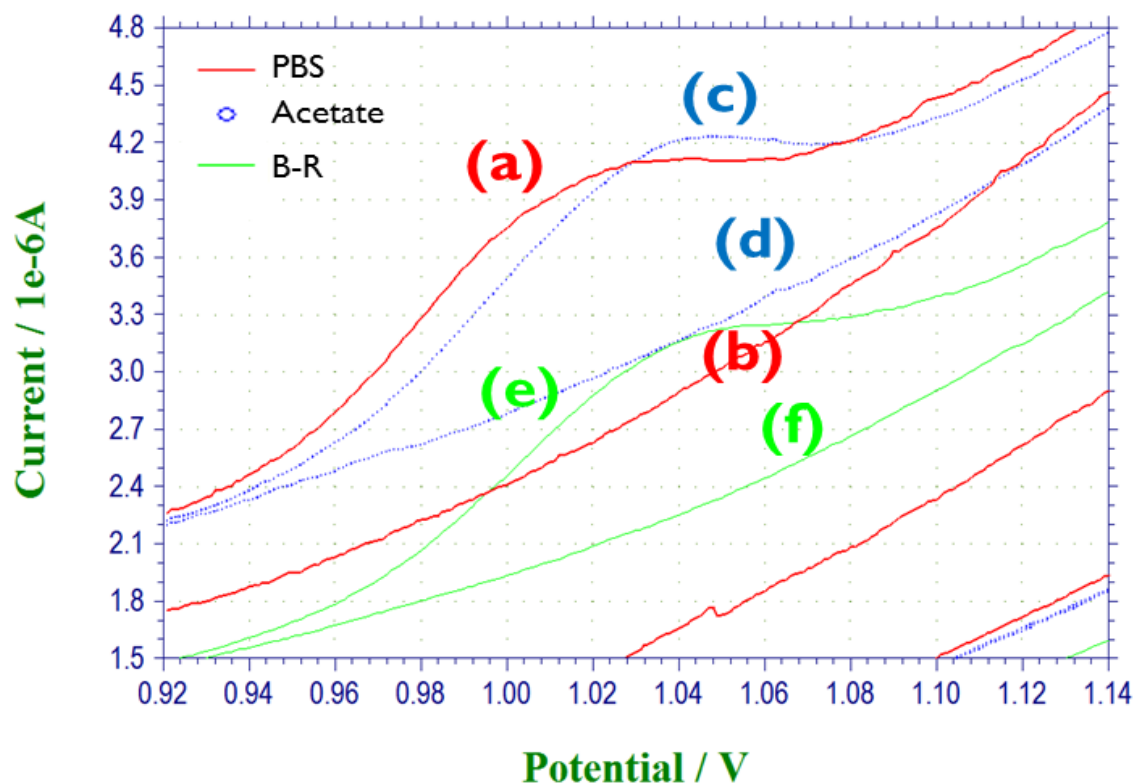


圖 4-11、電化學系統之緩衝溶液對檸檬黃檢測影響探討，(a) PBS with 500 ppm TT；(b) PBS；(c) acetate buffer with 500 ppm TT；(d) acetate buffer；(e) B-R buffer with 500 ppm TT；(f) B-R buffer。

Fig.4-11 Effect of the different electrolytes on the oxidation peak current for determination of TT. The oxygen plasma treatment time for SPCE was set for 60 min. Plasma intensity was 21 kV. The electrode spacing of oxygen plasma modification was 0.5 cm. CV responses obtained through (a) PBS with 500 ppm TT, (b) PBS, (c) acetate buffer with 500 ppm TT, (d) acetate buffer, (e) B-R buffer with 500 ppm TT (f) B-R buffer. Scan rate = 0.1 V/s.

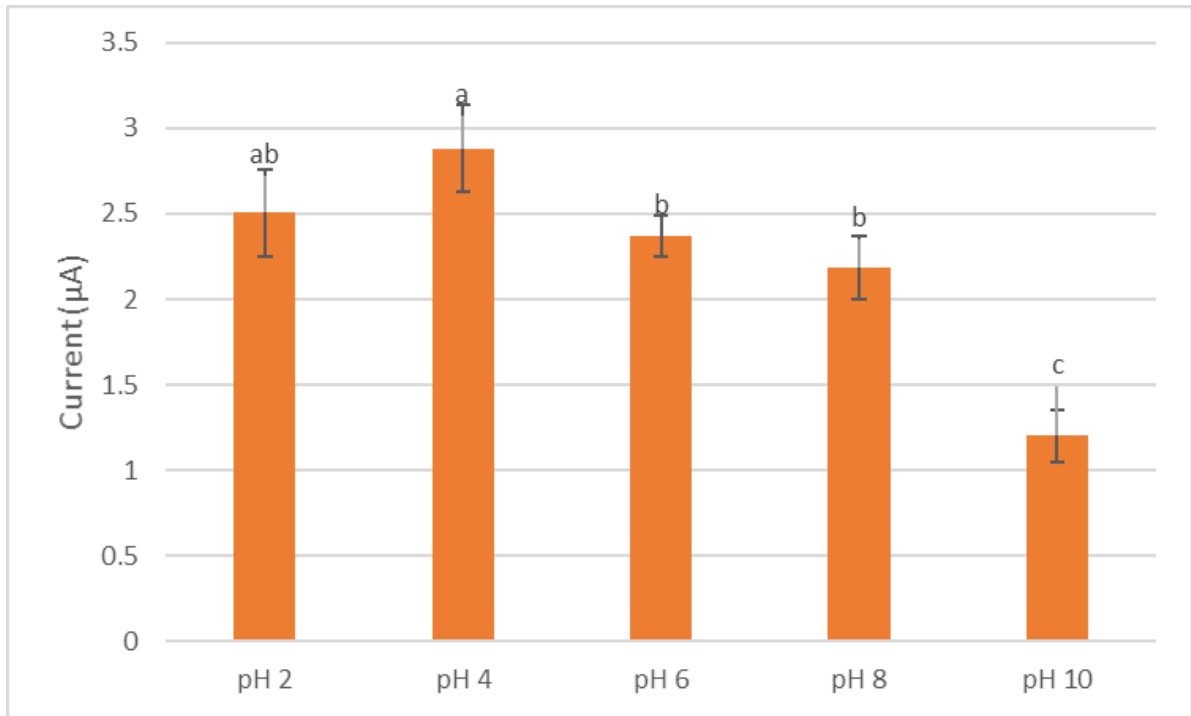
4.2.1 電化學系統檢測食品著色劑之最適 pH 值探討

在固定的緩衝溶液中，pH 值會影響檢測物發生氧化或者還原反應，包含緩衝溶液中氫離子的濃度以及檢測物發生氧化反應的電位，皆可能影響到檢測的結果。本研究測試 PBS 緩衝溶液從 pH 2 到 pH 10，環境溫度 25°C 條件之下，將 5 組不同 pH 的緩衝溶液掃描日落黃的檢測結果整理如圖 4-12。由結果可以發現日落黃的部分 pH 4 時測得的電流訊號 2.881 μA 與 pH 2 的 2.506 μA 之間經統計分析，兩者電流訊號並沒有顯著差異。

檸檬黃的測試結果，在與日落黃相同的檢測條件之下，檢測出來的結果如圖 4-13 所示，與日落黃有類似的趨勢，在偏酸性的條件下有較高的檢測電流訊號差。在 pH 10 的環境之下偵測不到電流訊號，推測可能是在較高的 pH 環境之下不易偵測到反應的電子轉移，所以在相同的檢測物濃度之下，其電流訊號差較低。

由以上兩組食品著色劑的狀況來看，皆在低 pH 值時有較高的電流訊號差，經由實驗的結果發現 pH 4 時的電流訊號差最高，故選擇 pH 4 的 PBS 當作掃描時的緩衝溶液。



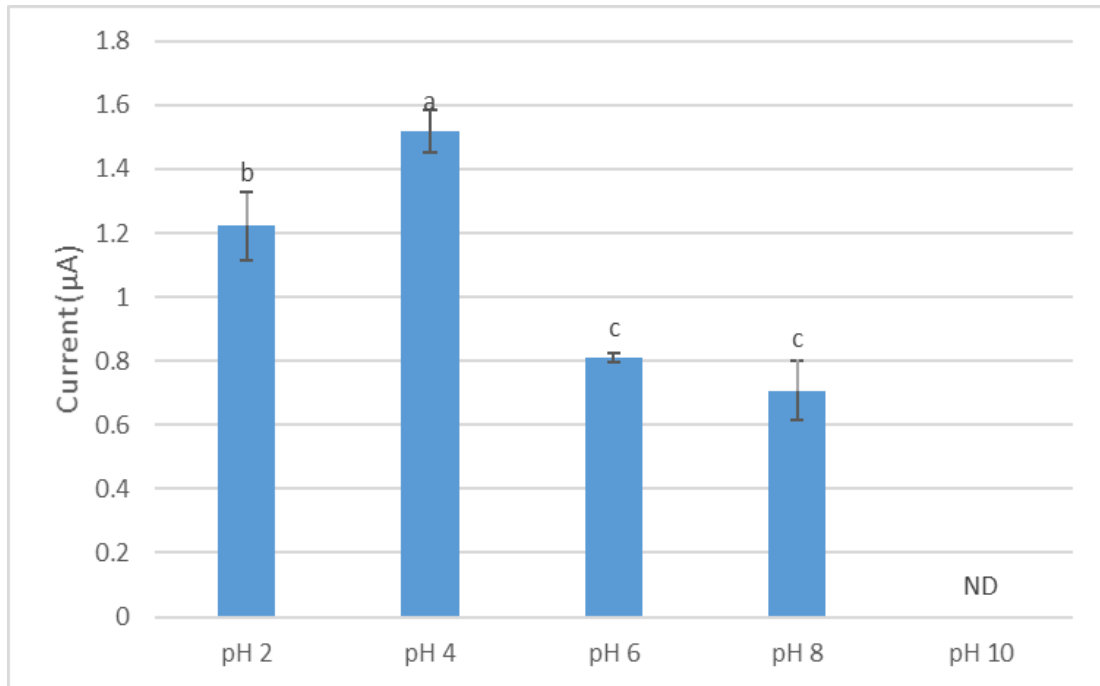


4-12、電化學系統磷酸鹽緩衝溶液 pH 值對日落黃檢測之影響。

Fig. 4-12 Influence of pH on the oxidation peak current for determination of SY.

The CV responses of oxygen plasma modified SPEC to 500 ppm SY were evaluated in 0.1 M PBS at various pH value. The error bars represent the standard deviation of triplicate measurements (n=3).

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different pH.



4-13、電化學系統磷酸鹽緩衝溶液 pH 值對檸檬黃檢測之影響。

Fig. 4-13 Influence of pH on the oxidation peak current for determination of TT.

The CV responses of oxygen plasma modified SPEC to 500 ppm TT were evaluated in 0.1 M PBS at various pH value. The error bars represent the standard deviation of triplicate measurements (n=3).

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different pH.

4.2.2 電化學系統檢測日落黃之反應槽溶液最適溫度探討

造成電化學檢測差異除了緩衝溶液 pH 外，溫度是一個重要的因子。在本研究中選擇了 25°C 到 55°C 作為探討的溫度範圍。檢測的條件為:10 ml PBS 緩衝溶液 (0.1 M)、掃描速率為 0.1 V/s，將溫度控制在 25°C、30°C、35°C、40°C、45°C、50°C 以及 55°C，並將每個溫度條件下檢測著色劑的電流訊號記錄下來後，得到結果如圖 4-14、圖 4-15。

圖 4-14 日落黃的檢測結果，由結果可以發現 45°C 時出現最大電流訊號差值，平均為 4.46 μ A，當溫度超過了 45°C 後訊號便開始下降，故以日落黃而言，45°C 為最適檢測溫度條件。

圖 4-15 為檸檬黃的掃描檢測結果，其分析條件同日落黃。結果除了 25°C 的電流訊號較低之外，其他的溫度量測出來都沒有顯著的差異，比較了兩組食品著色劑的溫度條件之後，選擇 45°C 作為檢測條件，因為其相對於其他溫度條件擁有較高的電流訊號差值。



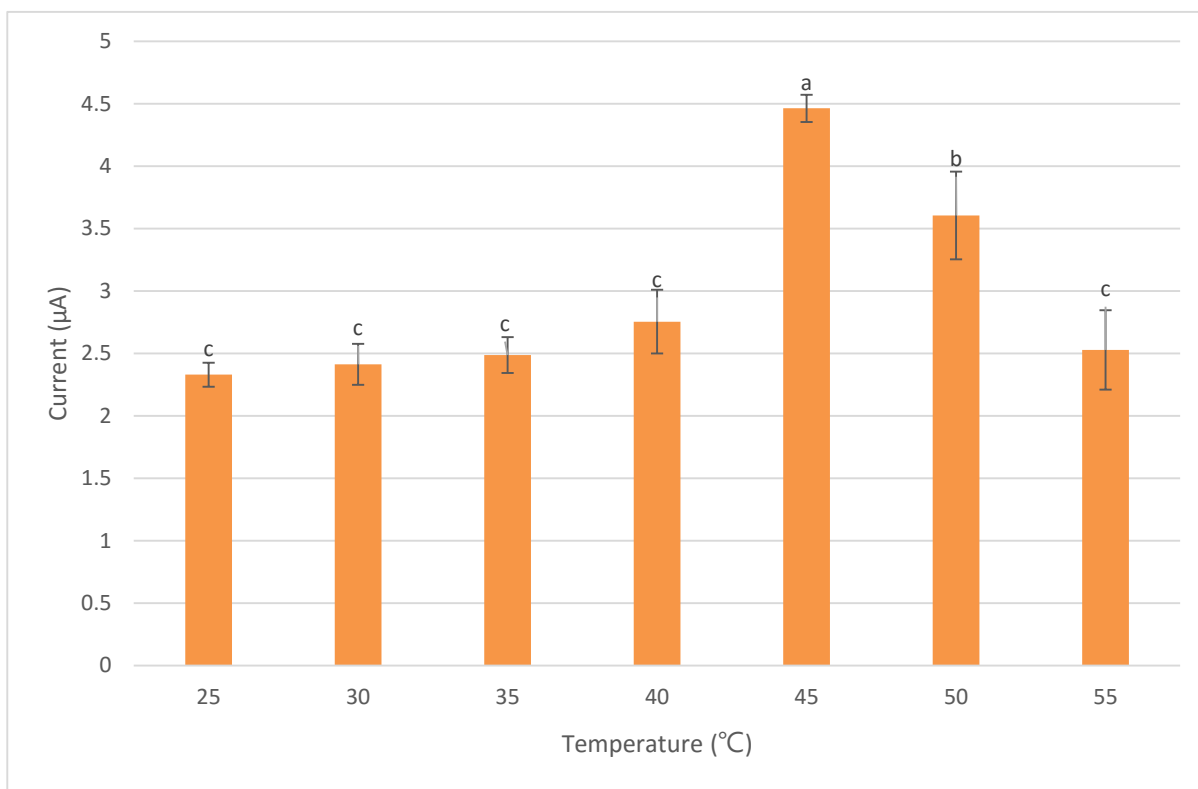


圖 4-14、電化學系統溫度對日落黃檢測之影響。

Fig. 4-14 Influence of temperature on the peak current of SY in 0.1 M PBS (pH 4.0) buffer. Scan rate = 0.1 V/s.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different temperature.

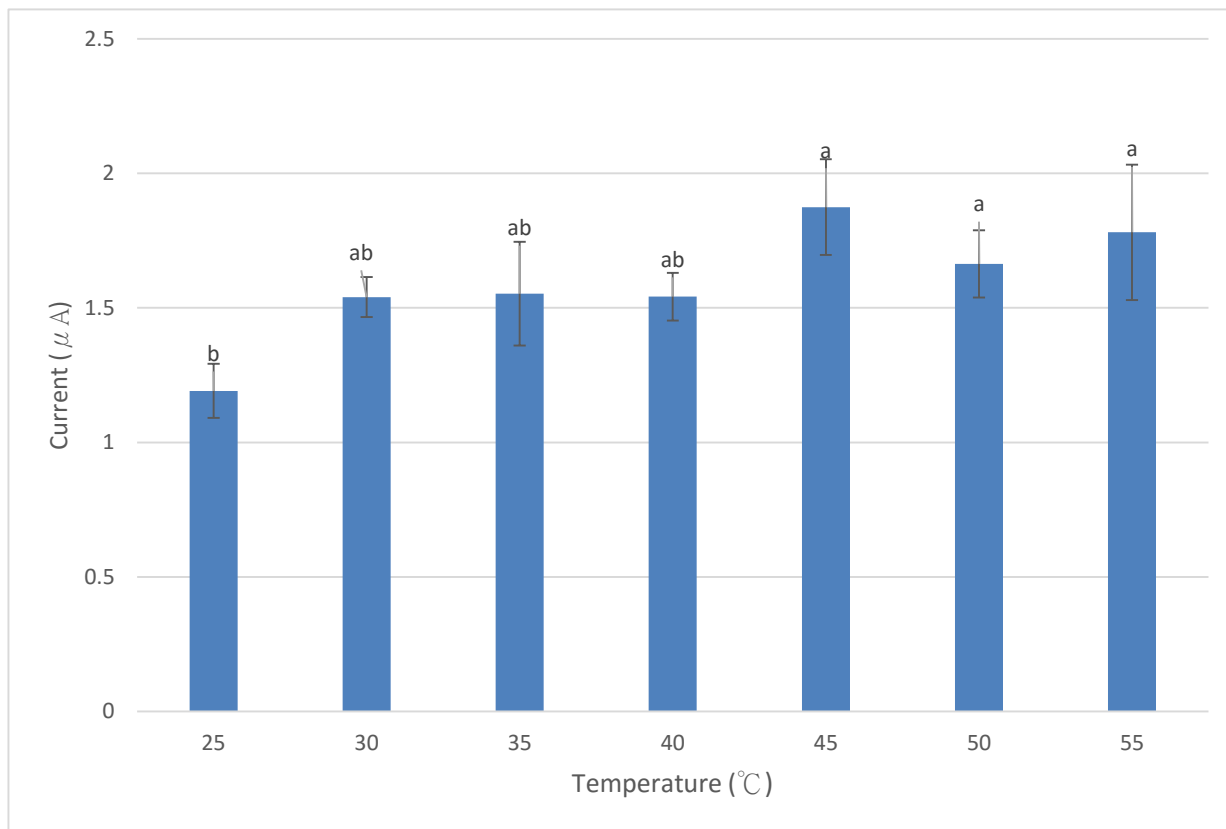


圖 4-15、電化學系統溫度對檸檬黃檢測之影響。

Fig. 4-15 Influence of temperature on the peak current of TT in 0.1 M PBS (pH 4.0) buffer. Scan rate = 0.1 V/s.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

Different lower-case letters indicate significant ($p < 0.05$) differences among currents generated in PBS buffer with different temperature.

4.2.3 電化學系統檢測食品著色劑之最適掃描速率探討

本節探討不同循環伏安法掃描速率與檢測電流訊號差之間的關係。檢測條件為: pH 4 之 PBS 緩衝溶液，檢測溫度為 45°C，掃描速率分別為 20、40、60、80、100、150、200、250、300、400 mV/s，將這 10 組的結果整理如圖 4-15、圖 4-16 所示。

圖 4-16、圖 4-17 分別為 500 ppm 日落黃、500 ppm 檸檬黃由低到高的掃描速率得到的檢測結果，由結果可以得知，在相同的檢測條件之下，越高的掃描速率所得到的電流訊號也越大，但是有文獻指出過快的掃描速率會使背景電流訊號放大，使得到的電流訊號容易被忽視或難以辨識，較難檢測濃度低的檢測物。(胡，2011)，另外在高速掃描的過程中，出現最大氧化峰電流的電位也跟著提升，在高電位掃描容易使檢測的訊號不穩定，影響到檢測的結果。

圖 4-18、圖 4-19 為日落黃、檸檬黃循環伏安法掃描速率開平方根對峰電流訊號。掃描速率開平方根與電流值之間的關係可以推測出分析物在電極表面的行為，如分析物於電極表面為吸附控制 (adsorption control) 機制，則其波峰電流值可以下式表示：

$$i_p = n^2 F^2 \nu V C_{o^*} / 4RT$$

其中 n 為電子轉移數， F 為法拉第常數， ν 為掃描速率， V 為溶液之體積， C_{o^*} 為整體溶液之濃度， R 、 T 皆為常數；如分析物在電極表面若為擴散控制 (diffusion control) 機制，則由線性掃描所得到的波峰電流可以下式表示：

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} \nu^{1/2} C_{o^*}$$

上式中 n 為電子轉移數， A 為電極表面積， D_o 為擴散係數， ν 為掃描速率， C_{o^*} 為溶液濃度。若電流值與掃描速率成正比，則說明

電極表面的機構為吸附控制，若電流值與掃描速率的開根號成正比，則可判斷此分析物在電極表面之電化學行為是經由擴散控制。

掃描速率會直接影響到檢測的時間，在固定的電位範圍中，越快速的掃描檢測時間越短，但是若反應速率較慢的化學反應，在快速掃描的過程可能無法察覺(胡，2011)。本研究的掃描速率從 20 mV/s 到 400 mV/s 的範圍皆屬於擴散控制的範圍中，故選擇 100 mV/s 做為檢測掃描速率。



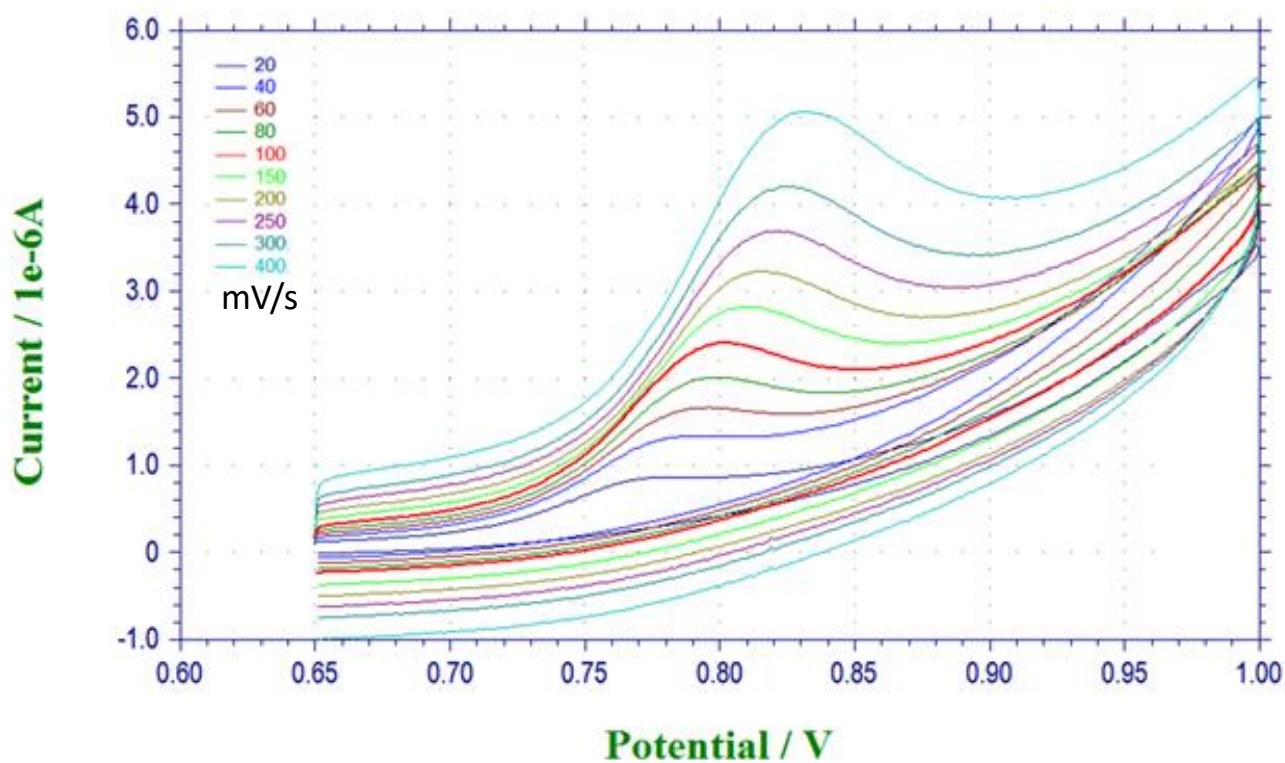


圖 4-16、電化學系統掃描速率對檢測日落黃影響之探討。

Fig. 4-16 Cyclic voltammograms of SY solution mixture in 0.1 M PBS (pH 4.0) buffer at 45°C: influence of scan rate on the peak potential profiles. (numbers 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 and 0.4 V/s represent the scan rate).

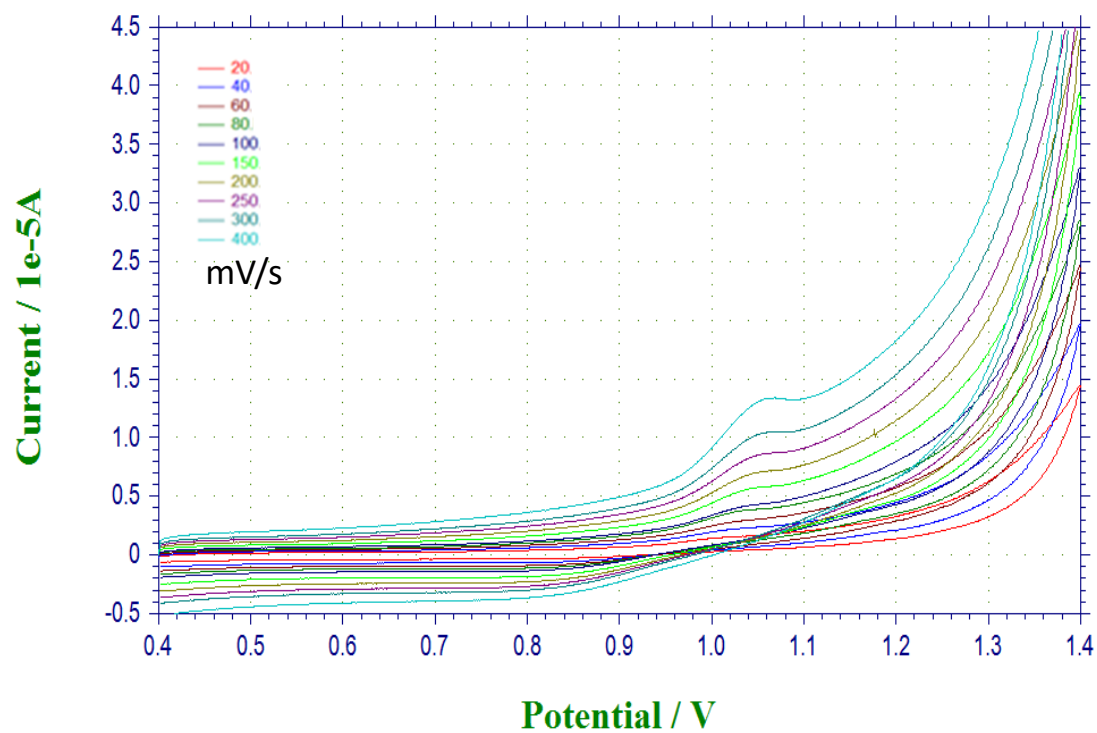


圖 4-17、電化學系統掃描速率對檢測檸檬黃影響之探討。

Fig. 4-17 Cyclic voltammograms of TT solution mixture in 0.1 M PBS (pH 4.0) buffer at 45°C: influence of scan rate on the peak potential profiles. (numbers 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 and 0.4 V/s represent the scan rate).

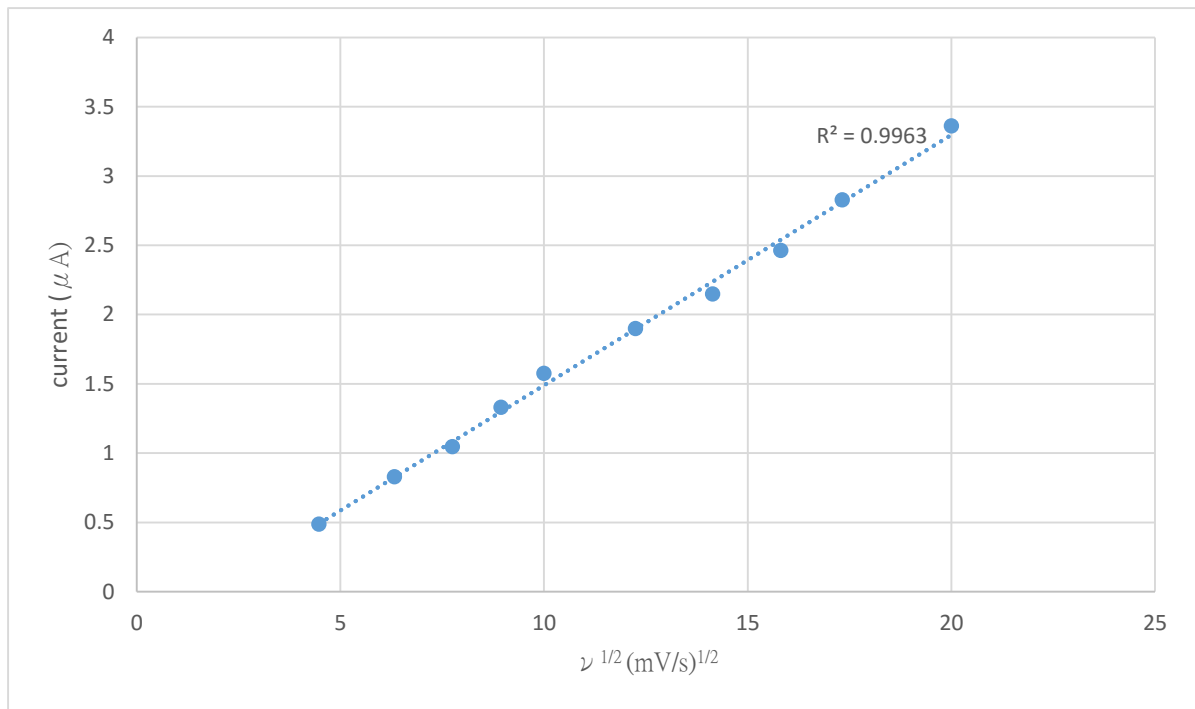


圖 4-18、日落黃掃描速率的平方根對電流值之關係圖。

Fig. 4-18 Influence of scan rate on the peak current and CV scan rate of SY.

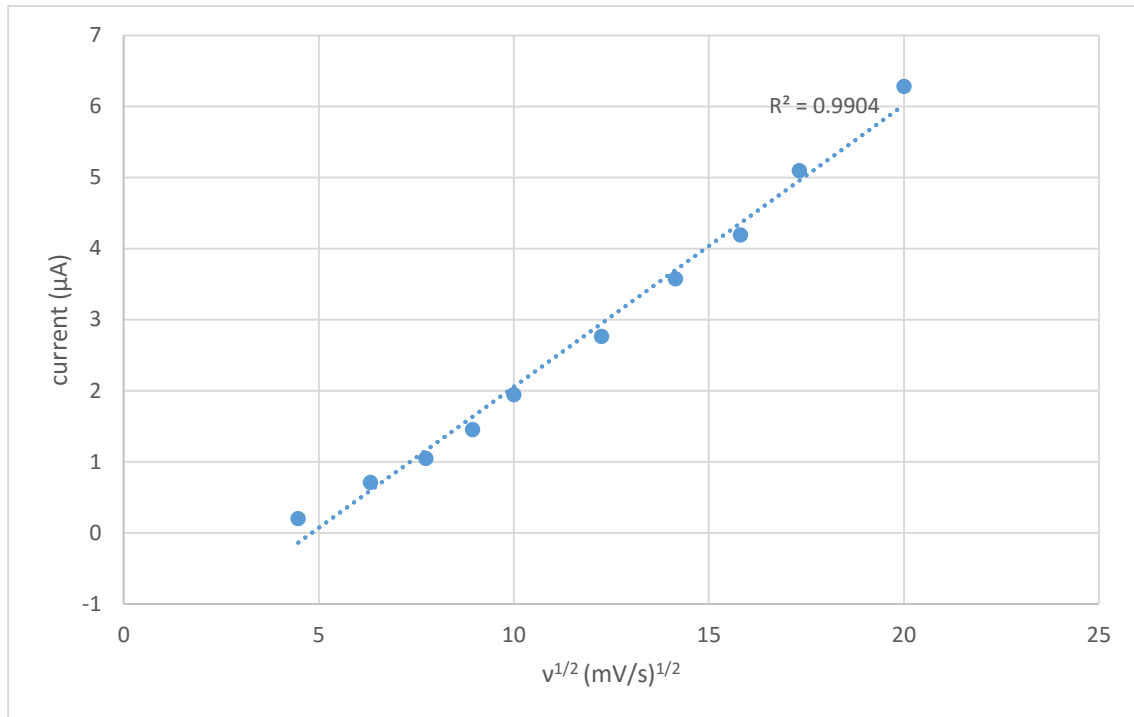


圖 4-19、檸檬黃掃描速率的平方根對電流值之關係圖。

Fig. 4-19 Influence of scan rate on the peak current and CV scan rate of TT.

4.2.4 氧氣電漿修飾網版印刷電極穩定度探討

本節探討氧氣電漿修飾網版印刷電極之穩定度，氧氣電漿修飾的條件為：電極修飾的時間 60，電壓為 21 kV，電極間距為 0.5 公分。以循環伏安法反覆檢測反應槽內之日落黃以及檸檬黃溶液，檢視經過氧氣電漿修飾之電極可維持之檢測次數。

電極穩定度之掃描圈數-電流圖如圖 4-20、圖 4-21 所示，分別為電化學循環伏安法掃描 SY、TT 10 次所得之電流結果，第 1 次至第 10 次平均得到值分別為 3.206 ± 0.222 、 $1.595 \pm 0.379 \mu\text{A}$ ，計算變異係數(Coefficient of variation)分別得到 6.9%、23.8%。比較兩種著色劑的實驗結果及變異係數，在重複掃描第三、第四次後，其循環伏安法掃描的電流訊號快速下降。本研究使用的電極為拋棄式網版印刷電極，由本節的實驗可以得知，氧氣電漿修飾的網版印刷電極無法被重複使用。



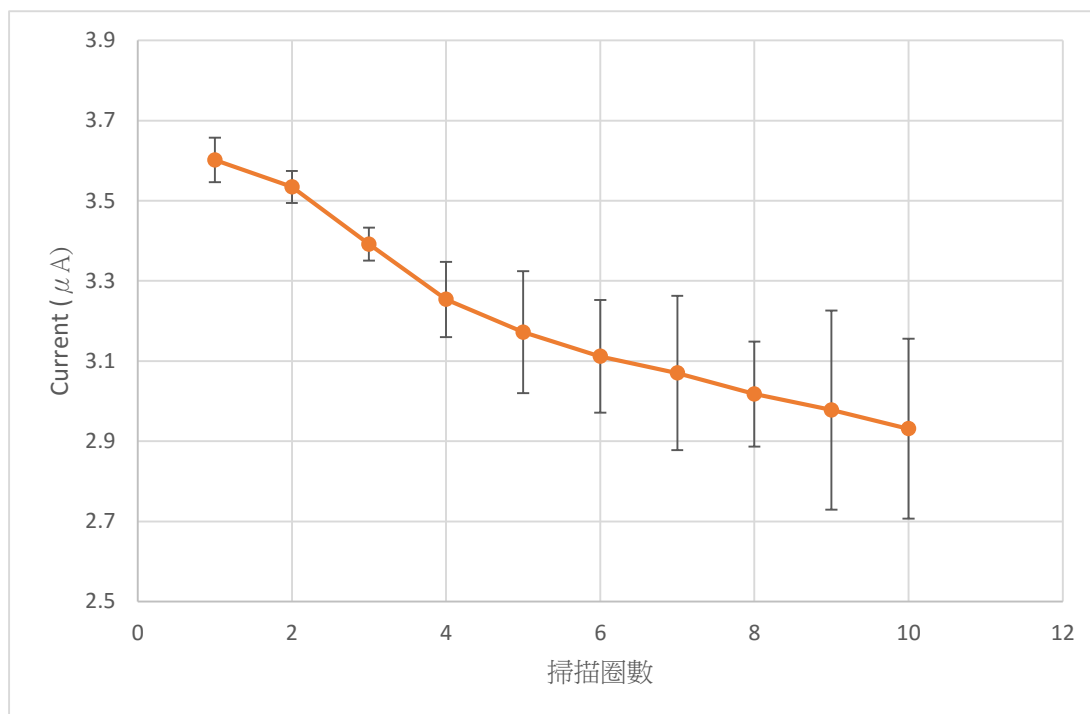


圖 4-20、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測日落黃穩定度探討。

Fig. 4-20 Scan times-current chart of the stability of oxygen plasma surface modification of SPCE detecting SY.

The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

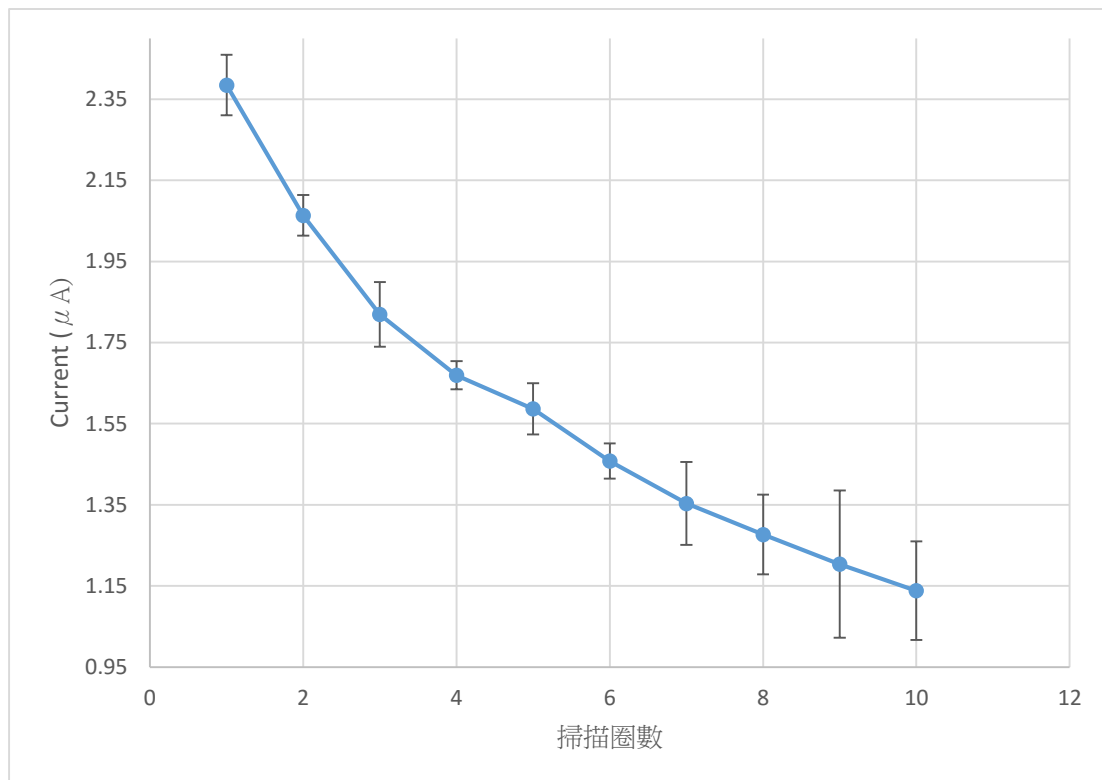


圖 4-21、氧氣電漿修飾網版印刷電極檢測檸檬黃穩定度探討。

Fig. 4-21 Scan times-current chart of the stability of oxygen plasma surface modification of SPCE detecting TT. The error bars represent the standard deviation of repetitive measurements (n=3).

4.3 電化學系統檢測食品著色劑之標準曲線

本節分別針對日落黃以及檸檬黃製作標準曲線，由於食品藥物管理署所公佈的法規中並沒有明確規範食品中日落黃、檸檬黃的添加量，故參考中華人民共和國衛生部所制定的食品添加劑使用衛生標準，設定的標準溶液濃度範圍從 50 ppm 到 800 ppm，選擇了先前的條件當作檢測的參數：在 45°C 環境溫度之下，取 10 ml 濃度為 0.1 M 的 PBS (pH 4) 緩衝溶液，分別加入不同濃度的檸檬黃、日落黃 100 μ l，在循環伏安法掃描速率為 100 mV/s 之下進行掃描，以銀/氯化銀、白金絲、網版印刷電極組成三電極系統進行檢測，將不同的標準品濃度所對應的電流訊號記錄下來，製作成檸檬黃以及日落黃的標準曲線。

兩組人工食品著色劑的線性範圍日落黃為 20-800 ppm，檸檬黃的線性範圍為 50-800 ppm。為探討 2 組人工著色劑之間是否有相互干擾的情況，除了單獨檢測日落黃 (SY)、檸檬黃 (TT) (圖 4-22、圖 4-23 橘色標準曲線) 之外，另外分別在各組不同濃度的日落黃標準品中加入固定 200 ppm 的檸檬黃 (SY+200 ppm TT)；相同的，在各組不同濃度的檸檬黃標準品中加入固定 200 ppm 的日落黃 (TT+200 ppm SY；圖 4-22、圖 4-23 藍色標準曲線)。這 4 組線性回歸直線方程式分別為：

$$\text{SY}+200 \text{ ppm TT: } y = 0.0037x + 0.3554, R^2=0.9974$$

$$\text{SY: } y = 0.0037x + 0.3479, R^2 = 0.9988$$

$$\text{TT}+200 \text{ ppm SY: } y = 0.0031x + 0.4451, R^2=0.9960$$

$$\text{TT: } y = 0.003x + 0.4640, R^2 = 0.9955$$

日落黃(圖 4-22)在含檸檬黃的環境中其標準曲線方程式的斜率為 0.0037，與未添加檸檬黃時的斜率相同，代表檸檬黃在檢測的環境中並不會干擾日落黃的掃描。在檸檬黃的掃描結果當中，含日落黃的標準曲線方程式的斜率為 0.0031，未添加日落黃的標準曲線斜率為 0.003。SY(圖 4-22)、TT(圖 4-23)的標準曲線 R^2 皆在 0.995 以上，代表在其檢測的濃度範圍內有良好的線性關係，可以用來分析待測物的人工著色劑濃度。日落黃及檸檬黃偵測極限為 12.2 ppm、34.1 ppm ($3\sigma/m$ ， σ ：STEVD， m ：slope)。



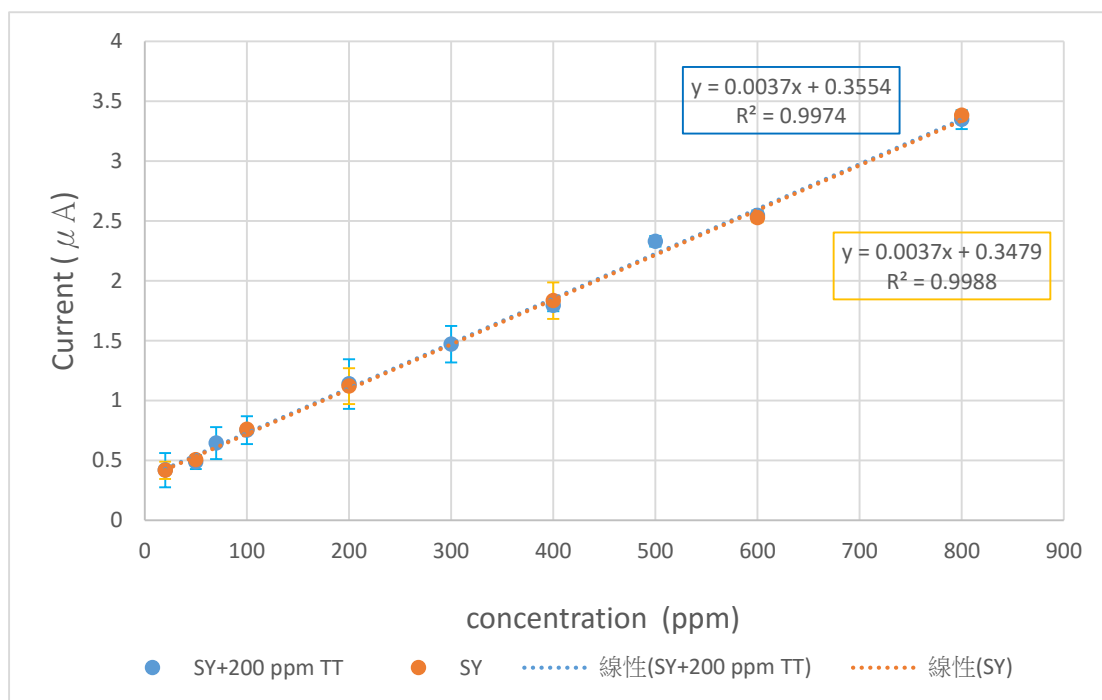


圖 4-22、電化學系統檢測日落黃之標準曲線。

Fig. 4-22 The calibration curve of detecting SY (orange cruve) and SY with 200 ppm TT (blue cruve) by electrochemical system (n=3).

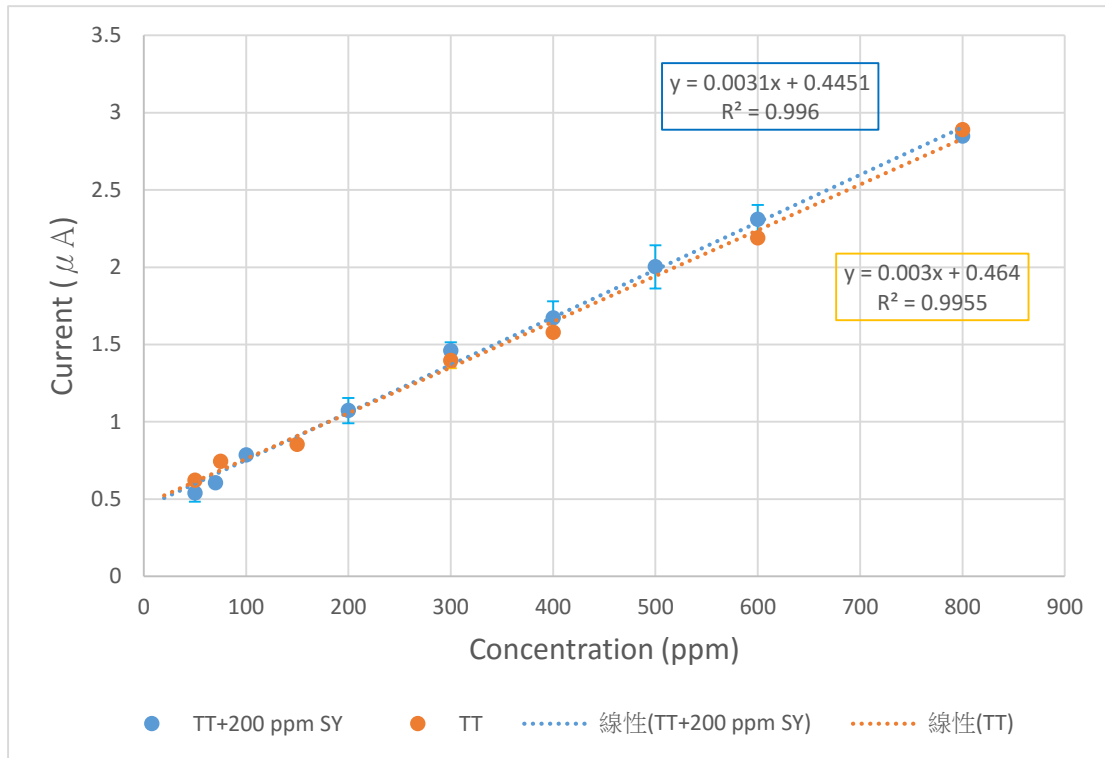


圖 4-23、電化學系統檢測檸檬黃之標準曲線。

Fig. 4-23 The calibration curve of detecting TT (orange curve) and TT with 200 ppm SY (blue curve) by electrochemical system (n=3).

4.4 電化學及 HPLC 檢測實際樣品之結果比較

本研究分別針對日落黃及檸檬黃各選擇了 5 種市售樣品，分別依照前述的方法進行前處理。在量測樣品時，進行回收率的測試，在樣品中額外添加已知濃度的標準品，使樣品除了原本含有的著色劑之外，也含有已知濃度的標準品，進行回收率測試的原因是為了確認檢測系統的準確度，一般食品不會在外包裝中標示著色劑添加量，所以只能仰賴傳統測試方法以及本研究所開發的電化學方法進行比較，並沒有一個已知的濃度可以當作基準參考，故在本研究中選擇了外加 100 ppm 以及 500 ppm 兩組濃度的標準品進行回收率試驗。由於台灣食品藥物管理署目前並沒有針對日落黃以及檸檬黃訂定添加標準，所以在此參考中華人民共和國衛生部公布的食品添加劑使用衛生標準，作為依據。回收率的公式為：

$$\text{回收率(\%)} = \frac{(\text{添加樣品中待測物測定量} - \text{原樣品中待測物測定量})}{\text{標準品添加量}} \times 100\%$$

可以藉由公式推斷本研究開發出來的檢測系統針對不同濃度食品著色劑的精準度，以樣品芭樂乾為例，其計算的方式如附錄八。

1. 樣品中檸檬黃含量檢測結果

電化學以及高效液相層析法的檢測結果如表 4-1 所示，利用 HPLC 檢測出來的檸檬黃濃度介於 71-274 ppm 之間，由於台灣現階段的法規中並沒以規範檸檬黃於食品中的使用量，故在產品包裝有標示，即沒有違規使用的疑慮。電化學系統檢測的結果，檸檬黃的濃度介於 73-326 ppm 之間。回收率有兩種濃度，在外加 100 ppm 的條件之下，回收率介於 55.2%-113.6% 之間，代表檸檬黃在較低濃度時回收率比較差。

影響氧化還原反應的物質主要是電活性物質，很容易在分析物發生氧化還原時也跟著反應，而影響到檢測的結果。一般常見的電活性物質包括了 ascorbic acid、citric acid、dopamine、uric acid；醣類如 fructose、lactose、galactose、glucose 以及常見離子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 K^{+} 、 Fe^{3+} 、 NO_3^- 、 Cl^- 。糖果樣品的成分中包含了葡萄糖、玉米糖漿、樹薯粉糊精、棕梠蠟、檸檬酸等成分，由於產品是檸檬風味的糖果，故推測為樣品中含有較高的檸檬酸，進而影響到檸檬黃發生氧化還原反應，當尚未添加檸檬黃標準品時電化學法檢測出來的濃度略低於 HPLC，在外加低濃度標準品時，得到的回收率僅有 87.7%，但是在外加高濃度檸檬黃標準品時，檸檬黃濃度從原本 192 ppm 額外添加 500 ppm，較原本樣品中檸檬黃濃度高出兩倍多，故受到的影響較低，回收率受到較小的影響。

巧克力樣品的成分比較複雜，因為其外層包覆糖衣，成分包含了砂糖、脫脂奶粉、乳糖、可可脂、大豆卵磷脂、鹽、糊精等。相同的樣品利用 HPLC 檢驗得到的濃度為 126.24 ppm，電化學測得 111.79 ppm，由以上成分分析影響檢測結果的原因可能為乳糖等醣類或者鹽類解離後產生的離子，影響到氧化還原反應，因為糖衣佔據整體的比例高，故有較高的機率影響到電化學循環伏安

法的掃描，當額外添加標準品時，干擾物比重降低，所以回收率在 500 ppm 時較 100 ppm 更接近 100%。

水果糖的成分與糖果相似，為砂糖、葡萄糖、檸檬酸、檸檬酸鈉、糊精、棕櫚油、乙醯化己二酸二澱粉等，相同樣品經由電化學以及 HPLC 檢測後其濃度差約 52 ppm，其中可能會影響的成分為檸檬酸、檸檬酸鈉以及葡萄糖，這些皆是食品中常見的成分，故影響檢測可能性高。另外在外加 100 ppm 標準品回收率為 55.2%，在樣品中檸檬黃濃度較低的情況之下，電化學檢測分析時受的干擾較明顯。樣品利用 HPLC 量測獲得的濃度為 274.72 ppm，電化學分析法為 326 ppm，再加入 500 ppm 檸檬黃標準品之後，其回收率差距有降低，代表高濃度的標準品所受到干擾物影響較低。

香魚乾的成分包含了魚漿、麵粉、鹽、砂糖、辛香料、己二烯酸鉀等，在此樣品中電化學檢測結果與 HPLC 之間的差異為 10.9%，其中較可能影響檢測的成分為砂糖以及鹽類，由於此產品本身檸檬黃的濃度不高，故添加 100 ppm、500 ppm 標準品之後，干擾物比重下降，對於回收率影響較低。

芭樂乾測得的樣品濃度為 73.18 ppm 與 HPLC 檢測的結果誤差為 2.6%，其回收率在低濃度以及高濃度分別為 103.8% 以及 102.9%，屬於可以接受的範圍，有良好回收率。

2. 樣品中日落黃含量檢測結果

表 4-1 下半部為日落黃的電化學以及高效液相層析法檢測結果，利用 HPLC 檢測出來的日落黃濃度介於 21-236 ppm 之間，且五組樣品中有 3 組低於 32 ppm，分別是蒜片豆干、鐵板燒、百香果汽水，在電化學系統循環伏安法掃描的過程當中皆沒有氧化波峰產生。可能的原因為含量低於檢測的極限，這些濃度皆符合規範，正常的情況之下沒有安全的疑慮。相較於本研究開發出來的系統檢測結果，比較可知 HPLC 針對日落黃濃度較低的樣品較能準確分析。

橘子汽水樣品的主要成分為碳酸水、高果糖漿、檸檬酸、香料，其成分較其他樣品單純。其中電化學檢測的結果與 HPLC 之間差了 6.4%，其成分中較可能影響檢驗結果為檸檬酸，因產品是橘子風味，故可能添加相較於其他干擾物質較高的比重。回收率再外加 100 ppm 以及 500 ppm 標準品則分別是 115.8% 以及 106.2%，當日落黃的濃度與樣品中的干擾物比例改變後，受到的影響也跟著降低，由結果中可以得知當碳酸飲料的日落黃濃度高於 300 ppm 時，電化學檢測系統可以較精準的檢驗。

綜觀兩種著色劑的檢驗結果可以得知，部分含日落黃樣品在低於 30 ppm 左右即無法檢出，表示本系統針對著色劑濃度較低的樣品進無法行定量，但是本研究所開發的系統主要針對第一線快速篩檢使用，故微量添加於食品中的著色劑並非系統檢測的考量重點。本感測器的干擾物主要為檸檬酸、檸檬酸鈉、抗壞血酸鹽類、糖類，本研究的樣品為汽水、水果乾、肉乾等加工等產品，其成分較為複雜，所含的干擾物比重可能較高，可能會影響到檢測的結果。本系統在檸檬黃濃度高於 500 ppm 時具有較佳的準確率，日落黃的回收率介於 88.5% 到 123.3% 之間，檸檬黃為 55.2% 到 113.6%。本研究檢驗的樣品著色劑濃度皆在 300 ppm 以下，

依照一般成年人的體重，不論是依照中國大陸或者是美國的相關法規皆不易超量，不須過度恐慌，但是這些添加著色劑的加工食品往往是學齡前的幼童較喜愛的食物，仍須注意謹慎篩選，盡量少食用。由於食品著色劑的種類有許多種，後續的研究可以朝向其他種類的著色劑或者其他種類的電漿修飾進行，期望可以再提升檢測的準確性，並應用在一般民眾的日常生活中。



表 4-1、以電化學法與高效液相層析法檢測食品中日落黃及檸檬黃。(n=3)

Table 4-1 Detection of SY and TT in foods by electrochemical sensor and HPLC (n=3).

檸檬黃	HPLC (ppm)	電化學 (ppm)	rel (%)	add (ppm)	found (ppm)	recovery (%)	add (ppm)	found (ppm)	recovery (%)
芭樂乾	71.35±1.95	73.18±2.81	2.6	100	176.96±6.60	103.8	500	587.60±44.06	102.9
香魚乾	242.98±8.64	269.44±8.32	10.9	100	348.76±28.43	79.3	500	768.71±21.43	99.9
水果糖	274.72±9.20	326.00±8.10	18.7	100	381.18±12.22	55.2	500	796.36±2.62	94.1
巧克力	126.24±1.25	111.79±0.45	-11.4	100	225.41±19.88	113.6	500	621.75±11.99	102.0
糖果	192.36±4.49	189.33±4.60	-1.6	100	277.02±9.98	87.7	500	691.66±54.92	100.5
日落黃	HPLC (ppm)	電化學 (ppm)	rel (%)	add (ppm)	found (ppm)	recovery (%)	add (ppm)	found (ppm)	recovery (%)
橘子汽水	172.88±5.66	161.78±31.83	-6.4	100	277.62±8.60	115.8	500	692.93±16.02	106.2
鱈魚乾	235.26±1.04	245.02±31.21	4.1	100	341.41±50.72	96.4	500	687.74±8.53	88.5
蒜片豆干	21.33±0.51	ND	-	100	117.94±0.55	117.9	500	506.92±18.33	101.4
鐵板燒	31.97±0.22	ND	-	100	122.52±4.25	122.5	500	487.92±37.88	97.6
百香果汽水	27.51±1.07	ND	-	100	123.32±16.77	123.3	500	507.32±22.64	101.5

$$\text{Recovery} = [(\text{present-detected}) / \text{spiked}] \times 100$$

表 4-2、電化學與 HPLC 檢測方式比較。

Table 4-2 Comparison between electrochemical and HPLC method.

	電化學	HPLC
優點	快速 不須複雜操作	較低的標準誤差 可檢測較低濃度樣品
缺點	無法檢測較低濃度樣品 部分樣品易受干擾	操作複雜 耗時



第五章、結論

本研究旨在開發電化學系統檢測，探討網版印刷電極經由氧氣電漿修飾過後，檢測食品中人工著色劑日落黃及檸檬黃。本研究可以歸納以下幾點結論：

1. 氧氣電漿修飾網版印刷電極修飾最適條件：使用的功率為 41.6 W (21 kV)，電極間距 0.5 公分，修飾時間為 60 分鐘。
2. 電化學檢測日落黃、檸檬黃最適條件：緩衝溶液使用 pH 值為 4.0 之 0.1 M PBS 緩衝溶液，最適溫度為 45°C，最適掃描速率 0.1 V/s。
3. 日落黃與檸檬黃的濃度對 CV 電流訊號的標準曲線分別為：

$$SY: y = 0.0037x + 0.3479, R^2 = 0.9988$$

$$TT: y = 0.003x + 0.4640, R^2 = 0.9955$$

應用電化學方法與高效液相層析法於實際樣品檢測上，樣品為常見的加工產品，包含糖果、汽水、肉乾、水果乾等食品，一共 10 組。此電化學系統檢測在實際樣品檢測的結果與高效液相層析之間的相對誤差值介於 -11.4% ~ 18.7% 之間，表示有部分的樣品可能含較多干擾物質，對於結果產生影響。本研究的樣品為汽水、水果乾、肉乾等加工等產品，在本研究的檢測條件中，影響較明顯的干擾物為檸檬酸、檸檬酸鈉、抗壞血酸鹽類、糖類，容易影響到檢測結果，導致實驗分析的誤差較高。由於國內目前沒有針對樣品訂定添加的限量標準，也沒有在限定以外的食品中檢出，所以無違法添加的問題。另外，在本研究中也針對回收率進行試驗，分別在 10 組樣品中額外加入 100 ppm 以及 500 ppm 兩種濃度之日落黃、檸檬黃標準溶液的檢測結果中，檸檬黃得到的回收率分別介於 55.2% ~

113.6%以及 94.1% ~ 102.9%，日落黃得到的回收率分別介於 96.4% ~ 123.3%以及 88.5% ~ 106.2%。此外有 3 組合日落黃的樣品無法被檢出，其濃度皆在 35 ppm 之下。

由於目前台灣僅針對部分的食物著色劑訂定限量使用標準，但是衛生福利部食品藥物管理署已經開始草擬更嚴謹的規範，相信在不久後的未來台灣會需要一套更簡單、快速的系統來檢測來進行食物著色劑的快速檢測，後續研究之方向可針對更複雜的修飾電極表面方法，提高檢測樣品中食物著色劑的靈敏度及專一性，期望可提高辨識超標樣品之成功率，應用於不同食品量檢測，給民眾更安心的選擇食品。



參考文獻

中文部分

- 吳朗。1992。感測與轉換原理元件與應用。全欣資訊圖書。1-20。
- 吳耀庭、黃曉鳳、溫俊祥。2004。電漿表面處理在生醫材料上之應用。工業材料雜誌。212：90-94。
- 周家華、崔英德、曾顥。2008。食品添加劑。化學工業出版社。82-89。
- 孟憲鈺。1969。電漿物理學。徐氏基金會出版部。7-9。
- 胡啓章。2011。電化學原理與方法。五南圖書出版公司。101-117。
- 姜郁美。2014。藥物食品安全週報。食品藥物管理署。478：1-4。
- 施正雄。2001。化學感測器專題報導簡介。化學季刊。59：199-200。
- 徐詮亮、高孟誠。2004。電漿殺菌技術原理及應用。台灣真空科技學會。17：21-34。
- 馬志英。2012。食物安全攻略。萬里機構出版有限公司。63-71。
- 陳中愷。2013。常壓常溫電漿應用於乾酪殺菌與品質變化檢測。東海大學食品科學系研究所碩士論文。27-29。
- 許益瑞、陳藹然。2014。科學研習。國立臺灣科學教育館。53：11-16。
- 黃炳照、莊睦賢。1999。電化學感測器。化工技術。7：150-161。

黃興閱。2006。感測器於實車碰撞測試之研究。財團法人車輛研究中心。11：8-17。

董家齊、陳寬任。2002。奇妙的物質第四態—電漿。科學發展。354：52-59。

劉麗雲。2010。食品衛生與安全。秀威資訊科技股份有限公司。121-125。

謝廣文。2003。農業自動化叢書—機電整合。台灣大學生物產業機電工程學系發行。12：11-12。

鍾協訓、曾志明。2001。液體電化學感測器的介紹與應用。中國化學會。59：201-206。

蕭千祐。2014。料理・台灣。財團法人中華飲食文化基金會。15：52-57。

蕭宏。2004。半導體製程技術導論。歐亞書局有限公司。319-321。

英文部分

- Ahlström L. H., C. S. Eskilsson., and E. Björklund. 2005. Determination of banned azo dyes in consumer goods. *Trends in Analytical Chemistry* 24: 49-56.
- Al-Ghamd A. F., and F. Kooli. 2013. A sensitive procedure for the rapid electrochemical determination of Eosin-Y Dye using Voltammetric techniques at a mercury electrode. *Journal of Materials and Environmental Science* 4 (5): 762-769.
- Arrigan D. W. M. 1994. Tutorial review. Voltammetric determination of trace metals and organics after accumulation at modified electrodes. *Analyst* 119: 1953-1966.
- Balakrishnan V. K., S. Shirin., A. M. Aman., S. R. de Solla., J. Mathieu-Denoncourt., and V. S. Langlois. 2016. Genotoxic and carcinogenic products arising from reductive transformations of the azo dye, Disperse Yellow 7. *Chemosphere* 146: 206-215.
- Bard, A. J., and L. R. Faulkner. 2001. *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, 2nd edition. John Wiley & Sons. New York, U.S.A. 1-87.
- Barroso M. F., N. de-los-Santos-Álvarez., C. Delerue-Matos., and M. B. Oliveira. 2011. Towards a reliable technology for antioxidant capacity and oxidative damage evaluation: electrochemical (bio)sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 30(1): 1-12.

- Berzas Nevado J. J., J. Rodríguez Flores., M. J. Villaseñor Llerena., and N. Rodríguez Fariñas. 1999. Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of Tartrazine, Quinoline Yellow and Patent Blue Vin commercial products. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 365: 383-388.
- Bernalte E., C. M. Snchez., and E. P. Gil. 2012. High-throughput mercury monitoring in indoor dust microsamples by bath ultrasonic extraction and anodic stripping voltammetry on gold nanoparticles-modified screen-printed electrodes. *Electroanalysis*. 25: 289-294.
- Bonan S., G. Fedrizzi., S. Menotta., and C. Elisabetta. 2013. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by highperformance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments* 99: 36–40.
- Britton H. T. S., and R. A. Robinson. 1931. CXCVIII.—Universal buffer solutions and the dissociation constant of veronal. *Journal of the Chemical Society* 1456-1462.
- Burgess R., and M. Deutscher. 2009. *Guide to Protein Purification*, 2nd Edition. Gulf Professional Publishing. U. S. A. 24-38.
- Cascarini de Torre, L. E., E. J. Bottani., A. Martínez-Alonso., A. Cuesta., A. B. García., and J. M. D. Tascón. 1998. Effects of oxygen plasma treatment on the surface of graphitized carbon black. *Carbon*. 36(3): 277-282.

- Cha C. S., J. Chen., and P. F. Liu. 1993. Improvement of the adhesion of a Nafion® modifying layer on electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 345(1–2): 463–467.
- Chen X. H., Y. G. Zhao., H. Y. Shen., L. X. Zhou., S. D. Pan., and M. C. Jin. 2014. Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1346: 123–128.
- Chen X., K. Wu., Y. Sun., and X. Song. 2013. Highly sensitive electrochemical sensor for sunset yellow based on the enhancement effect of alumina microfibers. *Sensors and Actuators B: Chemical* 185: 582-586.
- Damien W. M. 1994. Tutorial review. Voltammetric determination of trace metals and organics after accumulation at modified electrodes. *Analyst* 119(9): 1953-1966.
- de Andrade F. I., M. I. F. Guedes., Í. G. P. Vieira., F. N. P. Mendes., P. A. S. Rodrigues., and C. S. C. Maia. 2014. Determination of synthetic food dyes in commercial soft drinks by TLC and ion-pair HPLC. *Food Chemistry* 157: 193-198.
- Dominguez F. B., F. G. Diego., J. H. Mendez. 1990. Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography. *Talanta* 37(6): 655-658.

- Farre' M., R. Brix., and D. Barcelo. 2005. Screening water for pollutants using biological techniques under European Union funding during the last 10 years. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 24(6): 532–545.
- Gan T., J. Sun., W. Meng., L. Song., and Y. Zhang. 2013. Electrochemical sensor based on graphene and mesoporous TiO₂ for the simultaneous determination of trace colourants in food. *Food Chemistry* 141: 3731–3737.
- Gennaro M. C., E. Gioannini., S. Angelino., R. Aigotti., and D. Giacosa. 1997. Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 767: 87–92.
- Ghoreishi S. M., M. Behpour., and M. Golestaneh. 2011. Simultaneous voltammetric determination of Brilliant Blue and Tartrazine in real samples at the surface of a multi-walled carbon nanotube paste electrode. *Analytical Methods* 3: 2842-2847.
- Ghoreishi S. M., M. Behpour., and M. Golestaneh. 2012. Simultaneous determination of Sunset yellow and Tartrazine in soft drinks using gold nanoparticles carbon paste electrode. *Food Chemistry* 132(1): 637-641.
- Gilmartin M. A. T., and J. P. Hart. 1995. Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes. A review. *Analyst* 120: 1029-1045.

- González M., M. Gallego., and M. Valcárcel. 2003. Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 2121-2129.
- Gosetti F., P. Frascarolo., E. Mazzucco., V. Gianotti., and M. C. Bottaro. 2008. Photodegradation of E110 and E122 dyes in a commercial aperitif: A high performance liquid chromatography–diode array–tandem mass spectrometry study. *Journal of Chromatography A* 1202: 58–63.
- Jain R., M. Bhargava., and N. Sharma. 2003. Electrochemical Studies on a Pharmaceutical Azo Dye: Tartrazine. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 42: 243-247.
- Jurcovan M. M., and E. Diacu. 2014. Development of a reversed-phase high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of allura red ac and ponceau 4r in soft drinks. *Revista De Chimie* 65: 137-141.
- Kaur A. D., and U. Gupta. 2012. The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes. *Gazi University Journal of Science* 25: 579-588.
- Kucharska M., and J. Grabka. 2010. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta* 80: 1045–1051.
- Lane R. F., and A. T. Hubbard. 1973. Electrochemistry of chemisorbed molecules. I. Reactants connected to electrodes through olefinic substituents. *Journal of Physical Chemistry* 77(11): 1401–1410.

- Li W. Z., S. S. Xie., L. X. Qian., B. H. Chang., B. S. Zou., W. Y. Zhou., R. A. Zao., and G. Wang. 1996. Large-scale synthesis of aligned carbon nanotubes. *Science* 274: 1701-1703.
- Li X., and K. Horita. 2000. Electrochemical characterization of carbon black subjected to RF oxygen plasma. *Carbon*. 38(1):133-138.
- Ma M., X. Luo., B. Chen., S. Su., and S. Yao. 2006. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by highperformance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1103: 170-176.
- Martin C. R., T. A. Rhoades., and J. A. Ferguson. 1982. Dissolution of perfluorinated ion-containing polymers. *Analytical Chemistry* 54 (9): 1639-1641.
- McCann D., A. Barrett., A. Cooper., D. Crumpler., L. Dalen., K. Grimshaw., E. Kitchin., K. Lok., and L. Porteous. 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet* 370: 1560-1567.
- Medeiros R. A., B. C. Lourencao., R. F. Romeu., and F. F. Orlando. 2012a. Simultaneous voltammetric determination of synthetic colorants in food using a cathodically pretreated boron-doped diamond electrode. *Talanta* 97: 291-297.

- Medeiros R. A., B. C. Lourencao., R. F. Romeu., and F. F. Orlando. 2012b. Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. *Talanta* 99: 883-889.
- Miniotti K. S., C. F. Sakellariou., and N. S. Thomaidis. 2007. Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase highperformance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta* 583: 103-110.
- Nevado J. J., J. R. Flores., and M. J. Llerena. 1997. Square wave adsorptive voltammetric determination of sunset yellow. *Talanta* 44: 467-474.
- Okajima K., K. Ohta., and M. Sudoh. 2005. Capacitance behavior of activated carbon fibers with oxygen-plasma treatment. *Electrochimica Acta* 50: 2227-2231.
- Prado M. A., L. F. V. Boas., M. R. Bronze., and H. T. Godoy. 2006. Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 1136: 231-236.
- Shan D., Q. Shi, D. Zhu., and H. Xue. 2007. Inhibitive detection of benzoic acid using a novel phenols biosensor based on polyaniline-polyacrylonitrile composite matrix. *Talanta* 72(5): 1767-1772.
- Shen Y., X. Zhang., W. Prinyawiwatkul., and Z. Xu. 2014. Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products. *Food Chemistry* 157: 553-558.

Silva M. L., M. B. Garcia., J. L. Lima., and E. Barrado. 2007. Voltammetric determination of food colorants using a polyallylamine modified tubular electrode in a multicommutated flow system. *Talanta* 72: 282-288.

Skinner S. L., and J. F. Fowler. 1995. Contact anaphylaxis: A review. *American Journal of Contact Dermatitis* 6: 133-142.

Skoog D. A., F. J. Holler., and S. R. Crouch. 2007. Principles of instrumental analysis, 6th ed. Belmont, CA. 647-653.

Songyang Y., X. Yang., S. Xie., H. Hao., and J. Song. 2015. Highly-sensitive and rapid determination of sunset yellow using functionalized montmorillonite-modified electrode. *Food Chemistry* 173: 640–644.

Song Y. Z. 2010. Electrochemical reduction of sunset yellow at a multiwalled carbon nanotube (MWCNT)-modified glassy carbon electrode and its analytical application. *Canadian Journal of Chemistry* 88(7): 676-681.

Soylak M., Y. E. Unsal., and M. Tuzen. 2011. Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration. *Food and Chemical Toxicology* 49: 1183-1187.

Sorouraddin M. H., A. Rostami., and M. Saadati. 2011. A simple and portable multi-colour light emitting diode based photocolourimeter for the analysis of mixtures of five common food dyes. *Food Chemistry* 127: 308-313.

- Sun H., N. Sun., H. Li., J. Zhang., and Y. Yang. 2013. Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorants in meat by microwave-assisted extraction– solid-phase extraction–reversed-phase ultrahigh performance liquid chromatography. *Food Analytical Methods* 6: 1291-1299.
- Takada T., M. Nakahara., H. Kumagai., and Y. Sanada. 1996. Surface modification and characterization of carbon black with oxygen plasma. *Carbon*. 34(9) 34:1087-1091.
- Turak F., and M. U. Ozgur. 2013. Simultaneous determination of allura red and ponceau 4r in drinks with the use of four derivative spectrophotometric methods and comparison with high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International* 96: 1377-1386.
- Wang J., and D. L. Hutchins-Kumar. 1986. Cellulose acetate coated mercury film electrodes for anodic stripping voltammetry. *Analytical Chemistry* 58(2): 402-407.
- Wang M. l., Q. Sun, Y. Q. Gao, X. B. Yang., and J. W. Zhao. 2014. Determination of Sunset yellow in foods based on a facile electrochemical sensor. *Analytical Methods* 6: 8760-8766.
- Xu Y. 1996. Tutorial: Capillary electrophoresis. *The Chemical Educator* 1(2): 11-14.
- Yadav A., A. Kumar., A. Tripathi., and M. Das. 2013. Sunset yellow FCF, a permitted food dye, alters functional responses of splenocytes at non-cytotoxic dose. *Toxicology Letters* 217: 197-204.

Ye X., Y. Du., D. Lu., and C. Wang. 2013. Fabrication of β -cyclodextrin-coated poly (diallyldimethylammonium chloride)-functionalized graphene composite film modified glassy carbon-rotating disk electrode and its application for simultaneous electrochemical determination colorants of sunset yellow and tartrazine. *Analytica Chimica Acta* 779: 22-34.

Zhang W., T. Liu., X. Zheng., W. Huang., and C. Wan. 2009. Surface-enhanced oxidation and detection of Sunset Yellow and Tartrazine using multi-walled carbon nanotubes film-modified electrode. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74: 28-31.

Zheng M., A. Jagota, E. D. Semke, B. A. Diner, R. S. Mclean, S. R. Lustig, R. E. Richardson., and N. G. Tassi. 2003. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nature Materials* 2: 338-342.

Zorbas V., A. Ortiz-Acevedo, A. B. Dalton, M. M. Yoshida, G. R. Dieckmann, R. K. Draper, R. H. Baughman, M. Jose-Yacaman., and I. H. Musselman. 2004. Preparation and characterization of individual peptide-wrapped single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 126(23): 7222-7227.

Zoski C. G.. 2007. *Handbook of Electrochemistry* 1st editon. Else-vier, Amsterdam 33-77.

附錄一、日落黃特性。

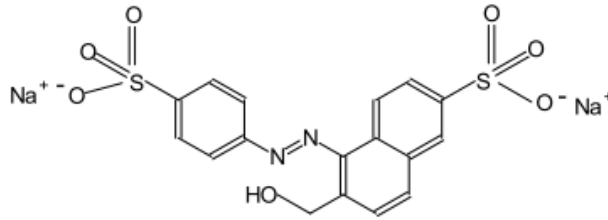
Appendix 1. The characteristics of Sunset Yellow (SY).

79年6月18日署授食字第879718號公告訂定
99年10月20日署授食字第0991903645號公告修正
102年9月4日部授食字第1021950290號公告修正

§ 09006

食用黃色五號

Sunset Yellow FCF (Food Yellow No. 5)



分子式： $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$

分子量：452.38

1. 含量：本品之色素總量應在85%以上。
2. 外觀：本品係由 disodium 6-hydroxy-5-(4-sulfonatophenylazo)-2-naphthalene-sulfonate、其他色素，混合非呈色物質氯化鈉及（或）硫酸鈉所組成。本品為橙紅色粉末或顆粒。
3. 鑑別：取本品 0.1 g，溶於 0.04N 醋酸銨溶液，測定此溶液之吸收光譜時，在波長 484 nm 處應有最大吸收，比吸光值為 0.054 L/(mg.cm)。
4. 溶解度：本品可溶於水，微溶於乙醇。
5. 乾燥減重：(1) 乾燥減重：取本品 2.0~3.0 g，精確稱定，置於已知重量之坩鍋內，於烘箱內以 135°C 乾燥至恆重，計算其減失重量(%)。
(2) 氯化物及硫酸鹽：取本品約 2 g，精確稱定，按照煤焦色素試驗法『氯化物及硫酸鹽』檢查法(附錄A-18)檢查之。
乾燥減重、氯化物及硫酸鹽(以鈉鹽計)之合計應在 15% 以下。
6. 水不溶物：取本品約 2 g，精確稱定，按照煤焦色素試驗法『水不溶物檢查法』(附錄 A-18)檢查之，其所含水不溶物應在 0.2% 以下。
7. 其他色素：利用濾紙層析法測定檢品中「其他色素」之含量，應在 5% 以下。
 - (1) 檢品溶液之配製
取檢品約 1.0 g，精確稱定，加水溶解使成 100 mL，供作檢品溶液。
 - (2) 標準溶液之配製
量取檢品溶液 5 mL，加水稀釋使成 100 mL，供作標準溶液。
 - (3) Trisodium 2-hydroxy-1-(4-sulfonatophenylazo)naphthalene-3,6-disulfonate 標準溶液之配製
取 trisodium 2-hydroxy-1-(4-sulfonatophenylazo)naphthalene-3,6-disulfonate 標準品 1.0 g，加水溶解使成 100 mL，供作標準溶液。
 - (4) 展開液之配製
2-丁酮、丙酮、水及氨水(比重 0.880)以 700：300：300：2 之比例混合，振搖 2 分鐘，取上層作為展開液。
 - (5) 測定法

79年6月18日署授食字第879718號公告訂定
99年10月20日署授食字第0991903645號公告修正
102年9月4日部授食字第1021950290號公告修正

- a. 將檢品溶液 0.1 mL 點於濾紙層析用濾紙上(Whatman No. 1, 20 cm x 20 cm), 室溫乾燥 1~2 小時或置於 50°C 乾燥箱乾燥 5 分鐘, 再置於室溫 15 分鐘後, 進行濾紙層析分析, 另取一濾紙層析用濾紙作空白試驗。同時用展開溶媒, 以上昇法展開至 17 公分。取出濾紙, 於 50~60°C 乾燥箱乾燥 10~15 分鐘後, 將各副色素斑點處, 分別剪成濾紙條, 分置於試管中, 各加水: 丙酮(1:1, v/v)混合溶液 5 mL, 搖動 2~3 分鐘, 再加 0.05N 碳酸氫鈉溶液 15 mL, 振搖混合後, 分別以 9 公分粗孔隙濾紙過濾至乾淨試管, 濾液供作色素萃取液。另取水: 丙酮(1:1, v/v)混合溶液 5 mL 及 0.05N 碳酸氫鈉溶液 15 mL, 經過濾後作為對照溶液。檢品之色素萃取液對應對照溶液, 置於 40-mm 密閉吸光槽, 於最大吸收波長處測吸光度。檢品色素萃取液所測得吸光度再以空白試驗之色素萃取液所測得吸光度校正之。另將標準溶液 0.1 mL 點於濾紙層析用濾紙上, 依前述檢品溶液相同步驟操作, 並測定總吸光度(A_s), 以下列計算式求得檢品中其他色素之含量(%), 其量應在 5% 以下。

$$\text{檢品中其他色素之含量(\%)} = 100 \times L \times D \times (A_a + A_b + A_c \dots A_n) / A_s$$

L: 檢品「其他色素」之限量

D: 檢品之色素總量(%)

$A_a + A_b + A_c \dots A_n$: 檢品溶液之所有其他色素吸光度之和

A_s : 標準溶液之吸光度

- b. 將 Trisodium 2-hydroxy-1-(4-sulfonatophenylazo) naphthalene-3,6-disulfonate 標準溶液 0.1 mL 點於濾紙層析用濾紙上, 以前述檢品溶液相同步驟操作, 確認斑點位置。Trisodium 2-hydroxy-1-(4-sulfonatophenylazo) naphthalene-3,6-disulfonate 不予計入時, 檢品中其他色素之含量應在 2% 以下。

8. 色素以外之有機化合物 : 利用高效液相層析法測定檢品中 4-amino-1-benzenesulfonic acid、3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid、6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid、7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid、4,4'-diazoaminodibenzenesulfonic acid 及 6,6'-oxydi-2-naphthalenesulfonic acid 之含量, 總量應在 0.5% 以下。

(1) 檢品溶液之配製

取檢品約 0.5 g, 精確稱定, 溶解於 0.02M 醋酸銨溶液 100 g 中, 供作檢品溶液。

(2) 標準溶液之配製

取 4-amino-1-benzenesulfonic acid、3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid、6-hydroxy-2-naphthalene sulfonic acid、7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid、4,4'-diazoaminodibenzene sulfonic acid 及 6,6'-oxydi-2-naphthalenesulfonic acid 標準品各約 10 mg, 精確稱定,

79年6月18日署授食字第879718號公告訂定
99年10月20日署授食字第0991903645號公告修正
102年9月4日部授食字第1021950290號公告修正

加醋酸銨溶液(7.7→1000)使成 100 mL，精確量取 10 mL，加醋酸銨溶液(7.7→1000)使成 100 mL，作為標準原液。各量取 1.0、1.5、2.0、2.5 及 3.0 mL 分別置於 100 mL 容量瓶，各加醋酸銨溶液(7.7→1000)定容，供作標準溶液。

(3) 移動相溶液之調製

移動相溶液 A：0.2 N 醋酸銨溶液

移動相溶液 B：甲醇

(4) 測定法

精確量取檢品溶液及各標準溶液 20 μL，分別依下列條件進行高效液相層析，就檢品溶液所得波峰滯留時間與標準溶液比較鑑別之，並以下列計算式求得檢品中 4-amino-1-benzenesulfonic acid、3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid、6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid、7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid、4,4'-diazoaminodibenzenesulfonic acid 及 6,6'-oxydi-2-naphthalenesulfonic acid 含量。

檢品中 4-amino-1-benzenesulfonic acid、3-hydroxy-2,7-naphthalenedisulfonic acid、6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid、7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid、4,4'-diazoaminodibenzenesulfonic acid 及 6,6'-oxydi-2-naphthalenesulfonic acid 之含量(%)

$$= \frac{C \times V}{M} \times 100$$

C：由標準曲線求出檢品溶液中 4-amino-1-benzene sulfonic acid、3-hydroxy-2,7-naphthalene disulfonic acid、6-hydroxy-2-naphthalenesulfonic acid、7-hydroxy-1,3-naphthalenedisulfonic acid、4,4'-diazoaminodibenzenesulfonic acid 及 6,6'-oxydi-2-naphthalenesulfonic acid 之濃度(mg/mL)

V：檢品定容之體積(mL)

M：檢品之採取量(mg)

高效液相層析條件：

層析管：C-18 on silica gel，5 μm，內徑 4.6 mm x 25 cm

前置管：C-18 on silica gel，5 μm，內徑 4.6 mm x 15 cm

可見光檢出器：波長 435 nm

移動相溶液：A 液與 B 液採線性梯度遞變(linear gradient)，2~100 % (4 %/min)

移動相流速：1.0 mL/min

9. 未磺酸化一級芳香族胺：(1) 苯胺(aniline)標準溶液之配製

於小燒杯中稱取預經蒸餾之苯胺標準品 0.1 g，再移至 100 mL 容量瓶，以水洗燒杯數次，合併洗液，於室溫下加 3N 鹽酸溶液 30

79年6月18日署授食字第879718號公告訂定
99年10月20日署授食字第0991903645號公告修正
102年9月4日部授食字第1021950290號公告修正

mL，以水定容。取10 mL，以水稀釋至100 mL (0.0001 g/mL)，
供作標準溶液，臨用時配製。

(2) 標準曲線之製作

量取標準溶液5、10、15、20及25 mL，分別置於100 mL容量瓶，
以1 N鹽酸溶液定容，量取10 mL至乾淨之乾燥試管，浸於裝有
冰水之燒杯內冷卻。各試管分別加50%溴化鉀溶液1 mL及0.5N
硝酸鈉溶液0.05 mL，混勻，於冰水浴中靜置10分鐘，進行重氮
化反應(diazotization)，再將試管內重氮化之標準溶液移入內含
0.05N R鹽(2-naphthol-3,6-disulfonic acid, disodium salt)溶液1 mL
及2N碳酸鈉溶液10 mL之25 mL容量瓶，以水數滴洗試管，併
入容量瓶中，再以水定容，蓋上瓶蓋，混勻，於暗處靜置15分鐘，
供作偶化(coupled)之標準溶液。另取1N鹽酸溶液10 mL、碳酸
鈉溶液10 mL及R鹽溶液2 mL，以水定容至25 mL之混合溶液
作為對照溶液。將各偶化之標準溶液及對照溶液，置於40-mm吸
光槽，於波長510 nm處測吸光度。以吸光度對應標準溶液每100
mL之苯胺含量(g)製作標準曲線。

(3) 測定法

取檢品約2.0 g，精確稱定，置於內含水100 mL之分液漏斗，以
水50 mL洗分液漏斗內壁，搖動以溶解檢品，再加1N氫氧化鈉
溶液5 mL。以每次甲苯50 mL萃取2次，合併萃取液，加1N氫
氧化鈉溶液10 mL洗萃取液，再以每次3 N鹽酸溶液10 mL萃取
3次，合併萃取液，以水定容至100 mL(T試液)。取T試液10 mL
至乾淨之乾燥試管，浸於裝有冰水之燒杯內冷卻。加溴化鉀溶液
1 mL及硝酸鈉溶液0.05 mL，混勻，置於冰水浴中靜置10分鐘，
進行重氮化反應(diazotization)，再將試管內重氮化之檢品溶液移
入內含R鹽溶液1 mL及碳酸鈉溶液10 mL之25 mL容量瓶，以
水數滴洗試管，併入容量瓶中，再以水定容，蓋上瓶蓋，混勻，
於暗處靜置15分鐘，供作偶化(coupled)之檢品溶液。另取T試液
10 mL、碳酸鈉溶液10 mL及R鹽溶液2 mL，以水定容至25 mL
作為對照溶液。將偶化之檢品溶液及對照溶液，置於40-mm吸光
槽，於波長510 nm處測吸光度，以下列計算式求得檢品中未磺酸
化一級芳香族胺之含量(%)，其量應在0.01%以下(以苯胺計)。

檢品中未磺酸化一級芳香族胺之含量(%) = $100 \times W_A / W$

W_A ：由標準曲線求出檢品中苯胺含量(g)

W ：檢品之採取量(g)

10. 醚萃出物：(1) 乙醚之純化

乙醚經蒸餾後，以氧化鋁管柱淨化，去除過氧化物。量取純化後
之乙醚10 mL，加入硫氰酸亞鐵溶液(0.1N硫氰酸亞鐵溶液與0.1N
硫氰化鉍溶液以1:1(v/v)之比例混合)50 mL，不應有紅色產生。

(2)測定法

懸掛一銅線於索氏萃取器(Soxhlet Extractor)之冷凝管，另置銅線圈0.5 g於蒸餾燒瓶。取本品約2 g，精確稱定(W_s)，置於索氏萃取器，以新鮮純化之乙醚150 mL迴流萃取5小時後，於水浴上將乙醚濃縮至約5 mL，置於已知重量之蒸發皿(W_1)，於水浴上蒸乾，再於105°C乾燥至恆量(W_2)，以下列計算式求得醚萃出物(%)，其量應在0.2%以下。

$$\text{醚萃出物}(\%) = 100 \times (W_2 - W_1) / W_s$$

11. 鉛 : 取本品1.0 g，精確稱定，按照鉛試驗法(附錄A-24)試驗之，其所含鉛(Pb)應在2 mg/kg以下。
12. 砷 : 取本品1.5 g，精確稱定，按照砷檢查第II-2法(附錄A-8)檢查之，其所含砷(以As計)應在2 mg/kg以下。
13. 含量測定 : 取本品約1.5 g，精確稱定，加水溶解並定容至250 mL，精確量取此液50 mL作為檢品溶液，按照煤焦色素試驗法(6)『含量測定』三氯化鈦法(附錄A-18)定量之，每mL之0.1N三氯化鈦液相當於11.31 mg之 $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$ 。

§ 09007

食用黃色五號鋁麗基
Sunset Yellow FCF Aluminum Lake

1. 含 量 : 含 Sunset Yellow FCF 10 % 以上。
2. 外 觀 : 橙黃色粉末，無臭。
3. 鹽酸及氨水不溶物 : 0.5 % 以下。
4. 水溶性氯化物及水溶性硫酸鹽 : 總量在 2 % 以下 (以 Cl, SO₄ 計)。
5. 砷 : 2 ppm 以下 (以 As₂O₃ 計)。
6. 重 金 屬 : 鋅 200 ppm 以下。
鐵 500 ppm 以下。
其他 20 ppm 以下 (以 Pb 計)。
7. 銀 : 0.05 % 以下。
8. 其他色素 : 不得檢出。
9. 乾 燥 減 重 : 30 % 以下 (135 °C, 6 小時)。
10. 分 類 : 食品添加物第 (九) 類。
11. 用 途 : 著色劑。



附錄二、檸檬黃特性。

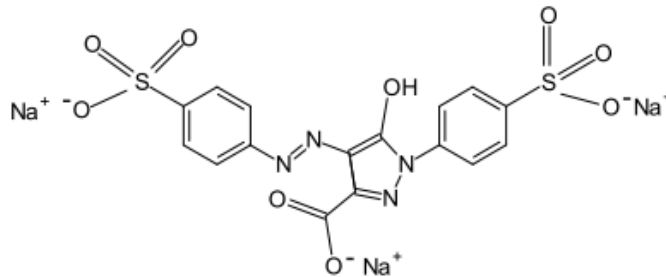
Appendix 2. The characteristics of Tartrazine (TT).

79年6月18日衛署食字第879718號公告訂定
102年9月4日部授食字第1021950290號公告修正

§09004

食用黃色四號

Tartrazine (Food Yellow no.4)



分子式： $C_{16}H_9O_9N_4S_2Na_3$

分子量：534.38

- 1.含量**：本品所含 $C_{16}H_9O_9N_4S_2Na_3$ 應在 85.0% 以上。
- 2.外觀**：本品為橙黃色～橙色粉末或粒，無臭。
- 3.鑑別**：
 - (1)本品之水溶液(1：1000)應呈黃色。
 - (2)本品之硫酸溶液(1：100)應呈黃色，取此液 2～3 滴，滴加於 5 mL 之水中時，應呈黃色。
 - (3)本品 0.1 g，加醋酸銨溶液(3：2000) 100 mL 溶解，量取此液 1 mL，加醋酸銨溶液(3：2000)使成 100 mL 之稀釋液，在波長 426～430nm 處，應具有最大吸收。
- 4.溶狀**：本品 0.1 g 溶於水 100 mL，其溶液應『澄明』。
- 5.水不溶物**：取本品約 2 g，精確稱定，按照煤焦色素試驗法(附錄 A-18)中『水不溶物』檢查法檢查之，其所含水不溶物量不得超過 0.3%。
- 6.氯化物及硫酸鹽**：取本品約 2 g，精確稱定，按照煤焦色素試驗法中『氯化物及硫酸鹽』檢查法檢查之，其所含氯化物及硫酸鹽之總量(分別以 Cl 及 SO_4 計)應在 6% 以下。
- 7. 砷**：取本品 0.5 g，按照煤焦色素試驗法中『砷』檢查法檢查之，其所含砷(以 As_2O_3 計)應在 2 ppm 以下。
- 8. 重金屬**：取本品 2.5 g，按照煤焦色素試驗法中『重金屬』檢查法處理作成檢品溶液後，再依①②③及⑤法檢查之，其所含重金屬應分別為鐵 500 ppm 以下，鉻 25 ppm 以下，鋅 200 ppm 以下，及其他重金屬(以 Pb 計) 20 ppm 以下。
- 9. 其他色素**：取本品 0.10 g，按照煤焦色素試驗法中『其他色素』檢查法①檢查之，其所含其他色素應在 3% 以下。
- 10. 乾燥減重**：本品於 135℃ 乾燥 6 小時，其減失重量不得超過 10%(附錄 A-3)。
- 11. 含量稱定**：取本品約 1.5 g，精確稱定，加水溶解並定容至 250 mL，量取此液 50.0 mL 作為檢品溶液，按照煤焦色素試驗法中『含量測定法』

79 年 6 月 18 日衛署食字第 879718 號公告訂定
102 年 9 月 4 日部授食字第 1021950290 號公告修正

①三氧化鈦法 C 定量之。每 mL 之 0.1N 三氧化鈦液相當於 13.359
mg 之 $C_{16}H_9O_9N_4S_2Na_3$ 。

§ 09005

食用黃色四號鋁麗基
Tartrazine Aluminum Lake

1. 含 量 : Tartrazine 10 % 以上。
2. 外 觀 : 黃色粉末，無臭。
3. 鹽酸及氨水不溶物 : 0.5 % 以下。
4. 水溶性氯化物及水溶性硫酸鹽 : 總量在 2 % 以下 (以 Cl, SO₄ 計)。
5. 砷 : 2 ppm 以下 (以 As₂O₃ 計)。
6. 重 金 屬 : 鋅 200 ppm 以下。
鐵 500 ppm 以下。
其他 20 ppm 以下 (以 Pb 計)。
7. 銀 : 0.05 % 以下。
8. 其他色素 : 不得檢出。
9. 乾燥減重 : 30 % 以下 (135 °C, 6 小時)。
10. 分 類 : 食品添加物第 (九) 類。
11. 用 途 : 著色劑。



附錄三、食品著色劑檢驗方法。

Appendix 3. The characteristics of Tertiary-butyl Hydroquinone.

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°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、可及及奶油等製品：

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℃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 氫水溶液(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%氫水溶液(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%氫水溶液 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%氫水溶液，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、氫水(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 µg/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 × 10 cm。

層析管溫度：30°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 → 4	90 → 50	10 → 50
4 → 8	50 → 40	50 → 60
8 → 12	40 → 20	60 → 80
12 → 12.1	20 → 90	80 → 10
12.1 → 15	90 → 90	10 → 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。

附錄四、台灣之食品著色劑使用範圍及限量暨規格標準。

Appendix 4. Scope and application standards of food colorants in Taiwan.

第（九）類 著色劑

編號	品名	使用食品範圍及限量	使用限制
001	食用紅色六號 Cochineal Red A (New Coccin)	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
002	食用紅色七號 Erythrosine	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
003	食用紅色七號鋁麗基 Erythrosine Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
004	食用黃色四號 Tartrazine	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
005	食用黃色四號鋁麗基 Tartrazine Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海

			帶、海苔、茶等不得使用。
006	食用黃色五號 Sunset Yellow FCF	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
007	食用黃色五號鋁麗基 Sunset Yellow FCF Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
008	食用綠色三號 Fast Green FCF	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
009	食用綠色三號鋁麗基 Fast Green FCF Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
010	食用藍色一號 Brilliant Blue FCF	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海

			帶、海苔、茶等不得使用。
011	食用藍色一號鋁麗基 Brilliant Blue FCF Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
012	食用藍色二號 Indigo Carmine	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
013	食用藍色二號鋁麗基 Indigo Carmine Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
014	β -胡蘿蔔素 β -Carotene	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
015	β -衍-8'-胡蘿蔔醛 β -Apo-8'-Carotenal	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海

			帶、海苔、茶等不得使用。
016	β -衍-8'-胡蘿蔔酸乙酯 β -Apo-8'-Carotenoat , Ethyl	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
017	4-4'-二酮- β -胡蘿蔔素 Canthaxanthin	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
020	蟲漆酸 Laccaic Acid	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
021	銅葉綠素 Copper Chlorophyll	1. 本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量以 Cu 計為 0.04g/kg 以下。 2. 本品可使用於膠囊狀、錠狀食品；用量為 0.5 g/kg 以下。	
022	銅葉綠素鈉 Sodium Copper Chlorophyllin	1. 本品可使用於乾海帶；用量以 Cu 計為 0.15g/kg 以下。 2. 本品可使用於蔬菜及水果之貯藏品、烘焙食品、果醬及果凍；用量以 Cu 計為 0.10g/kg 以下。 3. 本品可使用於調味乳、湯類及不含酒精之調味飲料；用量以 Cu 計為 0.064g/kg 以下。	

		<p>4. 本品可使用於口香糖及泡泡糖；用量以 Cu 計為 0.05g/kg 以下。</p> <p>5. 本品可使用於膠囊狀、錠狀食品；用量為 0.5 g/kg 以下。</p>	
023	鐵葉綠素鈉 Sodium Iron Chlorophyllin	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
024	氧化鐵 Iron Oxides	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
027	食用紅色四十號 Allura Red AC	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
028	核黃素(維生素 B2) Riboflavin	<p>1. 本品可使用於嬰兒食品及飲料；用量以 Riboflavin 計為 10mg/kg 以下。</p> <p>2. 本品可使用於營養麵粉及其他食品；用量以 Riboflavin 計為 56mg/kg 以下。</p>	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
029	核黃素磷酸鈉 Riboflavin Phosphate, Sodium	1. 本品可使用於嬰兒食品及飲料；用量以 Riboflavin 計為 10mg/kg 以下。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、

		2. 本品可使用於營養麵粉及其他食品；用量以 Riboflavin 計為 56mg/kg 以下。	生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
030	二氧化鈦 Titanium Dioxide	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
031	食用紅色四十號鋁 麗基 Allura Red AC Aluminum Lake	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
032	金 Gold (Metallic)	本品可於糕餅裝飾、糖果及巧克力外層中視實際需要適量使用。	
033	葉黃素 Lutein	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本品可使用於食品之裝飾及外層、調味醬；用量以 lutein 計為 25mg/kg 以下。 2. 本品可使用於糕餅、芥末、魚卵；用量以 lutein 計為 15 mg/kg 以下。 3. 本品可使用於蜜餞、糖漬蔬菜；用量以 lutein 計為 10 mg/kg 以下。 4. 本品可使用於冰品、零食點心（包括經調味乳製品）；用量以 lutein 計為 7.5 mg/kg 以下。 5. 本品可使用於不含酒精飲料、調味加工乾酪、魚肉煉製品、水產 	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。

		<p>品漿料、素肉、燻魚；用量以 lutein 計為 5 mg/kg 以下。</p> <p>6. 本品可使用於湯；用量以 lutein 計為 2.5mg/kg 以下。</p> <p>7. 本品可於食用之乾酪外皮、腸衣、特殊營養食品中視實際需要適量使用。</p>	
034	合成番茄紅素 (Synthetic Lycopene)	本品可使用於各類食品；用量以 lycopene 計為 50 mg/kg 以下。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
035	喹啉黃 Quinoline Yellow	本品可於膠囊狀、錠狀食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
036	喹啉黃鋁麗基 Quinoline Yellow Aluminum Lake	本品可於膠囊狀、錠狀食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等不得使用。
037	食用紅色六號鋁麗基 Cochineal Red A Aluminum Lake (New Coccine Aluminum Lake)	本品可於各類食品中視實際需要適量使用。	生鮮肉類、生鮮魚貝類、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果、味噌、醬油、海帶、海苔、茶等

			不得使用。
038	矽酸鋁鉀珠光色素 Potassium aluminum silicate-based pearlescent pigments	本品可用於糖果、膠囊狀、錠狀食品及口香糖，用量為 12.5g/kg 以下。	
039	焦糖色素 Caramel Colors	<p>第一類：普通焦糖(Plain caramel)： 可於各類食品中視實際需要適量使用。</p> <p>第二類：亞硫酸鹽焦糖 (Sulfite caramel)： 可於各類食品中視實際需要適量使用。</p> <p>第三類：銨鹽焦糖 (Ammonia caramel)：</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 本品可使用於糖漬果實、罐頭水果、油醋鹽浸漬果實、果醬、果凍、果皮凍；用量為 0.2 g/kg 以下。 2. 本品可使用於完全防腐之魚卵製品及油醋鹽浸漬蔬菜；用量為 0.5 g/kg 以下。 3. 本品可使用於奶精、冰品、白醋；用量為 1.0 g/kg 以下。 4. 本品可使用於黃豆製飲料；用量為 1.5 g/kg 以下。 5. 本品可使用於調味乳、發酵乳及布丁、奶酪等乳品甜點；用量為 2.0 g/kg 以下。 6. 本品可使用於飲料、乳酪、奶油、人造奶油及其類似製品；用量為 5.0 g/kg 以下。 7. 本品可使用於水果派餡；用量為 7.5 g/kg 以下。 8. 本品可使用於烏醋、點心零食、咖啡及其替代品；用量為 10.0 	生鮮肉類、生鮮水產品、生鮮豆類、生鮮蔬菜、生鮮水果等不得使用。

		<p>g/kg 以下。</p> <p>9. 本品可使用於未熟成乾酪；用量為 15.0 g/kg 以下。</p> <p>10. 本品可使用於豆皮、豆乾等黃豆製品(不包括醬類及飲料)、釀造醬油、口香糖、特殊營養食品、膳食補充品、味噌；用量為 20.0 g/kg 以下。</p> <p>11. 本品可使用於湯；用量為 25.0 g/kg 以下。</p> <p>12. 本品可使用於水產加工品；用量為 30.0 g/kg 以下。</p> <p>13. 本品可使用於蒸包、蒸糕、糕餅、烘焙食品、穀類、澱粉類點心(如粉圓、西米露、穀類早餐等)、米食加工品(如年糕、麻糬等)、蔬菜、海藻、堅果及種子加工品、巴沙米可醋、非釀造醬油、其他乾酪及其類似製品、穀類早餐(不包括燕麥片)、麵條、餅皮及相關製品、調味料、芥末、糖果、可及巧克力製品、調味糖漿、花生醬及其他調味醬；用量為 50.0 g/kg 以下。</p> <p>14. 本品可使用於濃色醬油；用量為 60.0 g/kg 以下。</p> <p>第四類：亞硫酸-銨鹽焦糖(Sulfite ammonia caramel)：</p> <p>1. 本品可使用於奶精及冰品；用量為 1.0 g/kg 以下。</p> <p>2. 本品可使用於代糖；用量為 1.2 g/kg 以下。</p> <p>3. 本品可使用於果醬、果凍、果皮凍；用量為 1.5 g/kg 以下。</p> <p>4. 本品可使用於調味乳、發酵乳及布丁、奶酪等乳品甜點；用量為</p>	
--	--	--	--

		<p>2.0 g/kg 以下。</p> <p>5. 本品可使用於穀類、澱粉類點心(如西米露、穀類早餐等)及米食加工品(如年糕、麻糬等);用量為 2.5 g/kg 以下。</p> <p>6. 本品可使用於乳酪、奶油、人造奶油及其類似製品;用量為 5.0 g/kg 以下。</p> <p>7. 本品可使用於水果派餡、油醋鹽浸漬果實、糖漬果實類及罐頭水果;用量為 7.5 g/kg 以下。</p> <p>8. 本品可使用於調味料、點心零食、咖啡及其替代品;用量為 10.0 g/kg 以下。</p> <p>9. 本品可使用於豆皮、豆乾等黃豆製品(不包括醬類及飲料)、粉圓、蛋製品、特殊營養食品、口香糖、膳食補充品;用量為 20.0 g/kg 以下。</p> <p>10.本品可使用於湯;用量為 25.0 g/kg 以下。</p> <p>11.本品可使用於魚卵及魚肉煉製品;用量為 30.0 g/kg 以下。</p> <p>12.本品可使用於乾酪及其類似製品、蔬菜、海藻、堅果及種子加工品、麵條、蒸包、蒸糕烘焙食品、糕餅、可及巧克力製品、飲料、醋、糖果、調味糖漿、芥末、花生醬、味噌及其他調味醬;用量為 50.0 g/kg 以下。</p> <p>13.本品可使用於醬油;用量為 60.0 g/kg 以下。</p>	
--	--	--	--

備註：本表為正面表列，非表列之食品品項，不得使用該食品添加物。

附錄五、中國大陸之日落黃使用範圍及限量暨規格標準。

Appendix 5. Scope and application standards of sunset yellow in China.

氢氧化钙	calcium hydroxide		
CNS号 01.202	INS号 526		
功能 酸度调节剂			
食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
01.03	乳粉（包括加糖乳粉）和奶油粉及其调制产品	按生产需要适量使用	
13.01	婴儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品	按生产需要适量使用	
13.05.01	孕产妇（乳母）配方食品	按生产需要适量使用	

氢氧化钾	potassium hydroxide		
CNS号 01.203	INS号 525		
功能 酸度调节剂			
食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
13.01	婴儿配方食品、较大婴儿和幼儿配方食品	按生产需要适量使用	
13.05.01	孕产妇（乳母）配方食品	按生产需要适量使用	

日落黄及其铝色淀	sunset yellow, sunset yellow aluminum lake		
CNS号 08.006	INS号 110		
功能 着色剂			
食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
01.01.02	调制乳	0.05	
01.02.02	调味和果料发酵乳	0.05	
01.04.02	调制炼乳（包括甜炼乳、调味甜炼乳及其它使用了非乳原料的调制炼乳）	0.05	
03.0	冷冻饮品（除外03.04食用冰）	0.09	
04.01.02.04	水果罐头（仅限西瓜酱罐头）	0.1	
04.01.02.05	果酱	0.5	
04.01.02.08	蜜饯凉果	0.1	
04.01.02.09	装饰性果蔬	0.2	
05.0	可可制品、巧克力和巧克力制品（包括类巧克力和代巧克力）以及糖果（除外05.01.01可可制品、05.04装饰糖果、顶饰和甜汁）	0.1	

05.03	糖果、巧克力制品包衣	0.2	
06.05.02.02	虾味片	0.1	
07.02.04	糕点彩装	0.1	
07.04	焙烤食品馅料（仅限饼干夹心）	0.1	
11.05.01	水果调味糖浆	0.5	
11.05.02	其他调味糖浆	0.3	
12.10	复合调味料	0.2	
12.10.02	半固体复合调味料	0.5	
14.02.03	果蔬汁（肉）饮料	0.1	
14.03.02	植物蛋白饮料	0.1	
14.04.01	碳酸饮料	0.1	
14.04.02.02	风味饮料（包括果味饮料、乳味、茶味及其他味饮料） （仅限果味饮料）	0.1	
14.06	固体饮料类	0.6	
14.07	乳酸菌饮料	0.1	
15.02	配制酒	0.1	
16.01	果冻	0.025	如用于果冻粉，以冲调倍数增加
16.05.01	油炸小食品	0.1	
16.06	膨化食品	0.1	

乳化硅油 emulsifying silicon oil

CNS号 03.001

INS号

功能 消泡剂

食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
14.0	饮料类（除外14.01包装饮用水类）	0.01	以聚二甲基硅氧烷计，固体饮料按冲调倍数增加使用量
16.07	其他（发酵工艺用）	0.20	

乳酸钙 calcium lactate

CNS号 01.310

INS号 327

功能 酸度调节剂、抗氧化剂、乳化剂、稳定剂和凝固剂、增稠剂

食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
05.02.08	胶基糖果	按生产需要适量使用	
12.10	复合调味料（仅限油炸薯片调味料）	10.0	

附錄六、中國大陸之檸檬黃使用範圍及限量暨規格標準。

Appendix 6. Scope and application standards of tartrazine in China.

檸檬黃及其鋁色淀		tartrazine, tartrazine aluminum lake	
CNS号 08.005		INS号 102	
功能 着色剂			
食品分类号	食品名称/分类	最大使用量g/kg	备注
01.02.02	调味和果料发酵乳	0.05	以檸檬黃計
01.04.02	调制煉乳（包括甜煉乳、调味甜煉乳及其它使用了非乳原料的调制煉乳）	0.05	以檸檬黃計
03.0	冷冻飲品（除外03.04食用冰）	0.05	以檸檬黃計
04.01.02.05	果醬	0.5	以檸檬黃計
04.01.02.08	蜜餞涼果	0.1	以檸檬黃計
04.01.02.09	装饰性果蔬	0.1	以檸檬黃計
04.02.02.03.02	盐渍的蔬菜	0.1	以檸檬黃計
05.0	可可制品、巧克力和巧克力制品（包括类巧克力和代巧克力）以及糖果（除外05.01.01可可制品）	0.1	以檸檬黃計
06.05.02.02	虾味片	0.1	以檸檬黃計
06.06	即食谷物，包括碾轧燕麦（片）	0.08	以檸檬黃計
07.02.04	糕点上彩装	0.1	以檸檬黃計
07.04	焙烤食品馅料（仅限饼干夹心和蛋糕夹心）	0.05	以檸檬黃計
11.05.01	水果调味糖浆	0.5	以檸檬黃計
11.05.02	其他调味糖浆	0.3	以檸檬黃計
12.09.03	香辛料醬（如芥末醬、青芥醬）	0.1	以檸檬黃計
12.10.01	固体复合调味料	0.2	以檸檬黃計，按稀释倍数减少使用量
12.10.02	半固体复合调味料	0.5	以檸檬黃計
14.0	饮料类（除外14.01包装饮用水类）	0.1	以檸檬黃計，固体饮料按冲调倍数增加使用量
15.02	配制酒	0.1	以檸檬黃計
16.01	果冻	0.05	以檸檬黃計，如用于果冻粉，以冲调倍数增加
16.05.01	油炸小食品	0.1	以檸檬黃計
16.06	膨化食品	0.1	以檸檬黃計

附錄七、美國之食品著色劑建議 ADI 標準值。

Appendix 7. ADI of color additives in USA.

Certified Color	Year Approved	ADI (mg/kg bw/day ⁵)	Pivotal Study(ies) (ADI basis)	ADI Dose Level (pivotal study)
FD&C Blue No. 1	1969	12.0	2-year plus bioassays in Charles River albino rats (<i>in utero</i> exposure) and CD-1 mice	Rat – 2.0% of diet (20,000 parts per million (ppm)) Mouse – 5.0% of diet (50,000 ppm)
FD&C Blue No. 2	1987	2.5	2-year plus bioassay in Charles River albino rats (CD) (<i>in utero</i> exposure)	Rat – 0.5% of diet (5,000 ppm)
FD&C Green No. 3	1982	2.5	2-year plus bioassays in Charles River CD-1 mice and albino (CD) rats (<i>in utero</i> exposure)	Rat – 5.0% of diet (50,000 ppm) Mouse – 5.0% of diet (50,000 ppm)
Orange B*	1966	None established	N/A	N/A
FD&C Red No. 3	1969	2.5	2-year study in rats (strain not noted), supported by 2-year study in dogs (beagle)	Rat – 0.5% of diet (5,000 ppm) Dog – 2.0% of diet (20,000 ppm)
FD&C Red No. 40	1971	7.0	21 month study in Charles River CD-1 rats	Rat – 1.39% of diet (13,900 ppm)
FD&C Yellow No. 5	1969	5.0	2-year bioassays in Charles River CD-1 mice and albino rats (CD) (<i>in utero</i> exposure); 2-year bioassay in dogs (beagle)	Dog – 2.0% of diet (20,000 ppm)
FD&C Yellow No. 6	1986	3.75	2-year bioassays in Charles River CD-1 mice and albino (CD) rats (2 long-term studies with <i>in utero</i> exposure)	Rat – 0.75% of diet (7,500 ppm)

*approved for use only in casings or surfaces of frankfurters and sausages at levels not to exceed 150 ppm by weight of food.



附錄八、樣品回收率計算。

Appendix 8. Recovery of real sample detection.

回收率的公式為：

$$\text{回收率(\%)} = \frac{(\text{添加樣品中待測物測量量} - \text{原樣品中待測物測量量})}{\text{標準品添加量}} \times 100\%$$

$$\text{芭樂乾回收率} = \frac{176.96 \text{ ppm} - 73.18 \text{ ppm}}{100 \text{ ppm}} \times 100\% = 103.78\%$$

