

醬油中雙十二烷基硫酸硫胺明檢驗方法之探討

蘇淑珠 游俊國 李樹其 劉兆宏 周薰修

行政院衛署藥物食品檢驗局

摘 要

雙十二烷基硫酸硫胺明之檢驗分為十二烷基硫酸鹽及維生素 B₁ 兩部份,前者利用 azure A 比色法測定,醬油於 pH 3 下,加 azure A 溶液,以氯仿萃取後,於波長 640nm 測吸光度;後者則採用螢光檢測液相層析法分析,檢體以 0.1N 鹽酸稀釋後,加含 1% 鐵氰化鉀之 20% NaOH 溶液,反應生成 thiochrome 後,加磷酸中和,再以異丁醇萃取,最後利用高效液相層析儀分析定量。檢體中添加相當於 3、5、10、12 及 15 ppm laurylsulfate 之雙十二烷基硫酸硫胺明時,其回收率以 azure A 比色法檢測為 98.04~98.89%,以螢光檢測液相層析法分析為 91.57~92.53%,變異係數皆小於 5%。經探討結果,兩種方法皆以 0.7ppm 以下視為未檢出。

本研究於民國 80 年 10 月至 81 年 5 月於全省抽驗市售醬油檢體國產 27 件,日本進口 36 件,共計 63 件,經檢測結果,國產檢體全部未檢出雙十二烷基硫酸硫胺明,日本進口檢體檢出 8 件,兩種方法所測得之數據幾乎一致,其中 4 件超過本署公告『食品添加物使用範圍及用量標準』中以 laurylsulfate 計 10ppm 以之規定。

前 言

日本內海及原田於 1954 年將鹽酸硫胺明 (thiamine hydrochloride, TC1) 與十二烷基硫酸鈉 (sodium lauryl sulfate, SLS) 反應得到幾乎不具吸濕性、難溶於水且具有界面活性作用之雙十二烷基硫酸硫胺明 (thiamine dilaurylsulfate, TLS) 的結晶,並於昭和 33 年 10 月 18 日獲日本厚生省核准為食品添加物。TLS 因具有強界面活性、又有乳化作用及能與油脂類充分混合等特性,因此被廣泛添加於白米、小麥粉、麵包、麵類、醬油、味噌、乳製品及米菓等作為營養強化劑⁽¹⁾。

中島隆曾實驗證明含食鹽 17.5%, 總氮 1.58% 及酒精 1.5% 之醬油中,添加 TLS 10ppm 以上即有防霉效果。另外於含鹽 5、10~15 及 20% 之醬油中分別添加 TLS 25~30、15 及 5ppm,亦有明顯之防霉作用⁽²⁾。衛生署於民國 79 年 2 月 19 日公告 TLS 可使用於醬油中作為防腐劑,用量以 laurylsulfate 計為 0.01g/kg 以下⁽³⁾。經查目前唯一查驗登記之食品添加物 TLS,是從日本進口之產品,其成分含 TLS、monosodium fumarate 及

lactose,據業者表示國內至今尚無醬油製造廠添加 TLS 當作防腐劑用。

TLS 之檢驗可分為 TC1 及 LS 兩部分。TC1 之測定有微生物法⁽⁴⁾、螢光比色法^(2,5,6) 及 HPLC^(5,7-11) 等方法,微生物法操作繁雜,需要時間培養,目前 HPLC 法已普遍被使用來分析,故本研究擬將醬油中之 TC1 反應生成 thiochrome 後,再利用 HPLC 分離,以螢光檢出器測定。LS 是一種陰離子界面活性劑,其分析方法有 methylene blue 比色法^(2,5)、Co-PADAP (bis[2-(5-chloro-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenolato] cobalt [III] chloride) 比色法⁽⁵⁾、azure A 比色法⁽⁶⁾ 及滴定法⁽¹²⁾,今擬就此等方法分析比較,以尋求簡易迅速且高感度之檢驗方法。

材料與方法

一、檢體來源

本研究所使之檢體係 80 年 10 月至 81 年 5 月於全省抽驗市售醬油檢體,國產 27 件,日本進口 36 件,共計 63 件。

二、試藥

雙十二烷基硫酸硫胺明(TLS)對照標準品由日本 Meiyu Sangyo Co., Ltd. 提供。鹽酸硫胺明(TC1)、十二烷基硫酸鈉(SLS)對照標準品及 azure A (C. I. 52005)均購自 Sigma Chemical Company, MO, USA。氫氧化鈉、鐵氰化鉀(potassium ferricyanide, $K_3Fe(CN)_6$)、硼砂(sodium tetraborate)、亞甲藍(methylene blue)、磷酸氫二鉀、硫酸、鹽酸、異丁醇、氯仿及磷酸均採用試藥特級,乙腈及甲醇均採用液相層析級(E. Merck, F.R. Germany)。

三、儀器與設備

(一)過濾裝置:Millipore Filter Holder, 濾膜孔徑 $0.45\mu m$, 直徑 47mm, 型號 HV, Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa Japan。

(二)分光光度計:Spectronic 3000 Array, Spectrophotometer, Milton Roy Company, NY, USA。

(三)螢光分光光度計:Shimadzu RF-500 Spectrofluorophotometer, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

(四)高效液相層析儀:

1.層析儀:Shimadzu LC-6AD Liquid Chromatograph, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

2.檢出器:Shimadzu RF-530 Fluorescence HPLC Monitor, Ex 370 nm, Em 420 nm, Shimadzu corporation, Kyoto, Japan。

3.層析管:Lichrospher 100 NH_2 -column, 25cm $\times$ 4.0mm i.d., particle size $5\mu m$, E. Merck, F.R. Germany。

4.積分儀:Shimadzu C-R4A Integrator, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan。

四、標準溶液之調製

取雙十二烷基硫酸硫胺明對照標準品 15.3mg 加 0.1N 鹽酸加熱溶解並定容至 100ml, 供作標準原液, 再以 0.1N 鹽酸稀釋配成 4.6~23.0 $\mu g/ml$ (相當於 laurylsulfate 3~15 $\mu g/ml$) 供作標準溶液。

五、鹼性鐵氰化鉀溶液之調製

取鐵氰化鉀 1g 及氫氧化鈉 20g 加水溶解並定容至 100ml。

六、鹼性硼酸緩衝液之調製

取 0.1M 硼砂溶液及 0.2N 氫氧化鈉溶液等量(v/v)混合而成。

七、Azure A 溶液之調製

取 azure A 40 mg 加水溶解後, 加 0.1N 硫酸 10 ml 及水使成 100ml。

八、移動相溶液之調製

乙腈與 pH8.4 之 0.09M 磷酸氫二鉀以 9:1 (v/v) 比例混合, 用孔徑 $0.45\mu m$ 之濾膜過濾, 取濾液作移動相溶液。

九、檢液之調製

(一)螢光檢測液相層析法

精確量取檢體 1 ml, 加 0.1N 鹽酸溶解並定容至 100ml, 取 5ml 置於離心瓶中, 加鹼性鐵氰化鉀溶液 5ml, 充分混合, 放置 1 分鐘, 隨即加磷酸 1ml 中和, 冷卻後加異丁醇 10ml, 充分振盪 1 分鐘, 靜置分層後, 上層液供作定量用檢液。

(二)Azure A 比色法

精確量取檢體 10ml, 置入 200ml 分液漏斗 A 中, 加水 50ml、1N 硫酸 3ml 及 azure A 溶液 1ml, 混合後, 加入氯仿 20ml, 振盪 1 分鐘, 重覆操作一次。另取 250ml 分液漏斗 B, 加水 100ml、1N 硫酸 3ml 及 azure A 溶液 1ml, 混合後, 再將分液漏斗 A 之氯仿層, 移入分液漏斗 B 中, 振盪 1 分鐘, 氯仿層以脫脂棉過濾(必要時氯仿層先離心), 重覆操作一次, 合併氯仿層, 加氯仿定容至 50ml, 供作定量用檢液。

十、分析條件

(一)螢光檢測液相層析法

高效液相層析條件:

分離管:Lichrospher 100 NH_2 -column

檢出器:螢光檢出器, Ex 370 nm, Em 420nm

移動相溶液:乙腈:0.09M K_2HPO_4 (pH 8.4) = 9:1

流速:1.5 ml/min

注入量:50 μl

(二)Azure A 比色法

分光光度計選用 640 nm

十一、檢量線之繪製

(一)螢光檢測液相層析法

取雙十二烷基硫酸硫胺明標準原液配製成

4.6、7.7、15.3、18.4 及 23.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (相當於含 laurylsulfate 3、5、10、12 及 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)五種濃度之標準溶液,精確量取標準溶液各 1ml,依九.(一)節之處理,反應生成 thiochrome,再精確量取 thiochrome 生成液各 50 μl ,分別注入液相層析儀,每一濃度作五重覆,以平均波峰面積及標準溶液之濃度繪製檢量線。

(二) Azure A 比色法

精確量取十一.(一)節所配製之雙十二烷基硫酸胺明標準溶液各 10ml,依九.(二)節之處理,反應後於可見光 640nm 處測定其吸光值,每一濃度作五重覆,繪製成檢量線。

十二、鑑別試驗及含量測定

(一) 螢光檢測液相層析法

精確量取檢液及濃度相近之 thiochrome 生成液各 50 μl ,分別注入液相層析儀,就檢液與 thiochrome 生成液所得波峰之滯留時間比較鑑別之。並由檢液所得之波峰面積,與檢量線比較,所得之濃度即為檢體中雙十二烷基硫酸胺明之含量(ppm)。

(二) Azure A 比色法

檢液之 200nm~700nm 之吸光圖譜與十一.(二)節比較鑑別之,並由檢液於 640nm 處測得之吸光值,與檢量線比較,所得之濃度即為檢體中雙十二烷基硫酸胺明之含量(ppm)。

十三、回收試驗

(一) 螢光檢測液相層析法

取檢體 1ml 分別添加 4.6、7.7、15.3、18.4 及 23.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之雙十二烷基硫酸胺明標準溶液各 1ml,每一添加量作五重覆,同時作空白試驗,其步驟依照九.(一)節處理之。

(二) Azure A 比色法

取檢體 10ml,分別添加 4.6、7.7、15.3、18.4 及 23.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之雙十二烷基硫酸胺明標準溶液各 10ml,每一添加量作五重覆,同時作空白試驗,其步驟依照九.(二)節處理之。

結果與討論

雙十二烷基硫酸胺明(TLS)又稱為 Vitamin B₁ laurylsulfate,係 34g 之鹽酸硫胺明(TC1)與 57g 之十二烷基硫酸鈉(SLS)反應而成之無色~白色結晶或白色結晶性粉末,幾乎無臭,難溶於水,但溶於熱水,易溶於乙醇、氯仿,不溶於乙醚及

丙酮⁽¹⁾。1g 之 TLS 含 TC1 0.41g 及 LS 0.65g。有關 TLS 之檢測可分為 TC1 及 LS 兩部分,以下就這兩種檢驗方法進行探討。

一、鹽酸硫胺明(TC1)

維生素 B₁ 之檢驗有微生物法⁽⁴⁾、螢光光度法^(2,5,6) 及 HPLC^(5,7-11) 等方法。以微生物作維生素之分析,主要是利用不同之菌種對某特定維生素之營養需求性不同的特性來分析,雖然靈敏度高,專一性強,但必須時間培養及熟練之分析技巧,方能獲得可靠的結果。傳統之螢光光度法係將檢體中之維生素 B₁ 於鹽酸酸性下加熱抽出,經 taka-diastase 或 α -amylase 等酵素分解,再以填充層析管柱淨化,蛋白質含量高之檢體,還必須除去蛋白質,最後再氧化生成螢光衍生物 thiochrome,並利用螢光分光光度計測其螢光強度,步驟相當繁雜。目前 HPLC 法已普遍被使用來分析維生素 B₁,為了去除醬油之干擾物質,建立簡便迅速之檢驗方法,進行下列之探討。

(一) 文獻資料回顧

Ishii 於鹼性下,將維生素 B₁ 與氰化溴反應生成 thiochrome,注入 HPLC 分離,層析條件為: NH₂-層析管,移動相乙腈:0.09M 磷酸鉀緩衝液(pH8.4)及螢光檢出器,Ex375nm,Em430nm⁽⁷⁾。

Fellman 等將檢體中之維生素 B₁ 於鹽酸酸性下加熱抽出,經 taka-diastase 處理後,再將維生素 B₁ 氧化成 thiochrome,加磷酸中和,以減少 thiamine disulfide 之形成,再通過 C₁₈ Sep-Pak,以達到濃縮效果,以 37% 甲醇:0.01M 磷酸緩衝液(pH7.0)為移動相,利用 C₈-Radial-PAK 層析管分離,以 Ex 360nm,Em 415nm 偵測⁽⁸⁾。

Fernando 等所採用之方法與 Fellman 相近,將檢體加酸水解並氧化成 thiochrome 後,加磷酸中和,最後以 C₁₈層析管分離,移動相為乙腈:0.01M 醋酸緩衝液(pH5.5) = 13:87,以螢光檢出器偵測⁽⁹⁾。

Kimura⁽¹⁰⁾、Mauro⁽¹¹⁾及日本衛生試驗法⁽⁵⁾所用的方法則是先將檢體經酸水解及酵素處理,所得之檢液注入 HPLC 分離,於後置反應槽與鹼性鐵氰化鉀反應生成 thiochrome,再以螢光檢出器偵測。

綜合以上之資料,本實驗擬採 Fellman 等所研發之螢光檢測液相層析法,將檢體稀釋,加氧化劑反應後,加磷酸中和,再以異丁醇抽出,最後利用 HPLC-螢光檢測分析。

(二)氧化劑之選擇

一般常用之氧化劑有氰化溴(BrCN)^(5,7) 及鐵氰化鉀^(6,8-11) 兩種,雖然氰化溴之氧化能力較強,但因毒性高⁽⁵⁾,故本實驗採用鐵氰化鉀。

(三)層析條件之探討

利用螢光分光光度計掃描結果, Thiochrome 於 Ex 370nm, Em 420nm 有最強螢光(見圖一),經分析比較結果,以乙腈:pH8.4 之 0.09M K_2HPO_4 (9:1)為移動相,利用 Lichrospher NH_2 -層析管之分離效果最好(見圖二)。

(四)加熱分解

食品中維生素 B_1 之定量,都經過酵素處理及層析管淨化,更由於維生素 B_1 種類不同,必須經加熱分解使成鹽酸鹽。有關 TLS 之檢驗,日本食品添加物公定書之方法係先將 TLS 加 $\text{KCl}\cdot\text{HCl}$ 試液加熱分解成 TC1,測定其含量後,再換算成 TLS⁽¹⁾。為瞭解加熱分解對反應生成之影響,取 $23.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 TLS 5ml 加 0.1N 鹽酸定容至 100ml,取此液 5ml,加含 1% 鐵氰化鉀之 15% NaOH 溶液 5ml,混合後加磷酸中和,冷卻後,加異丁醇 10ml 抽出,再利用上述層析條件測試。另

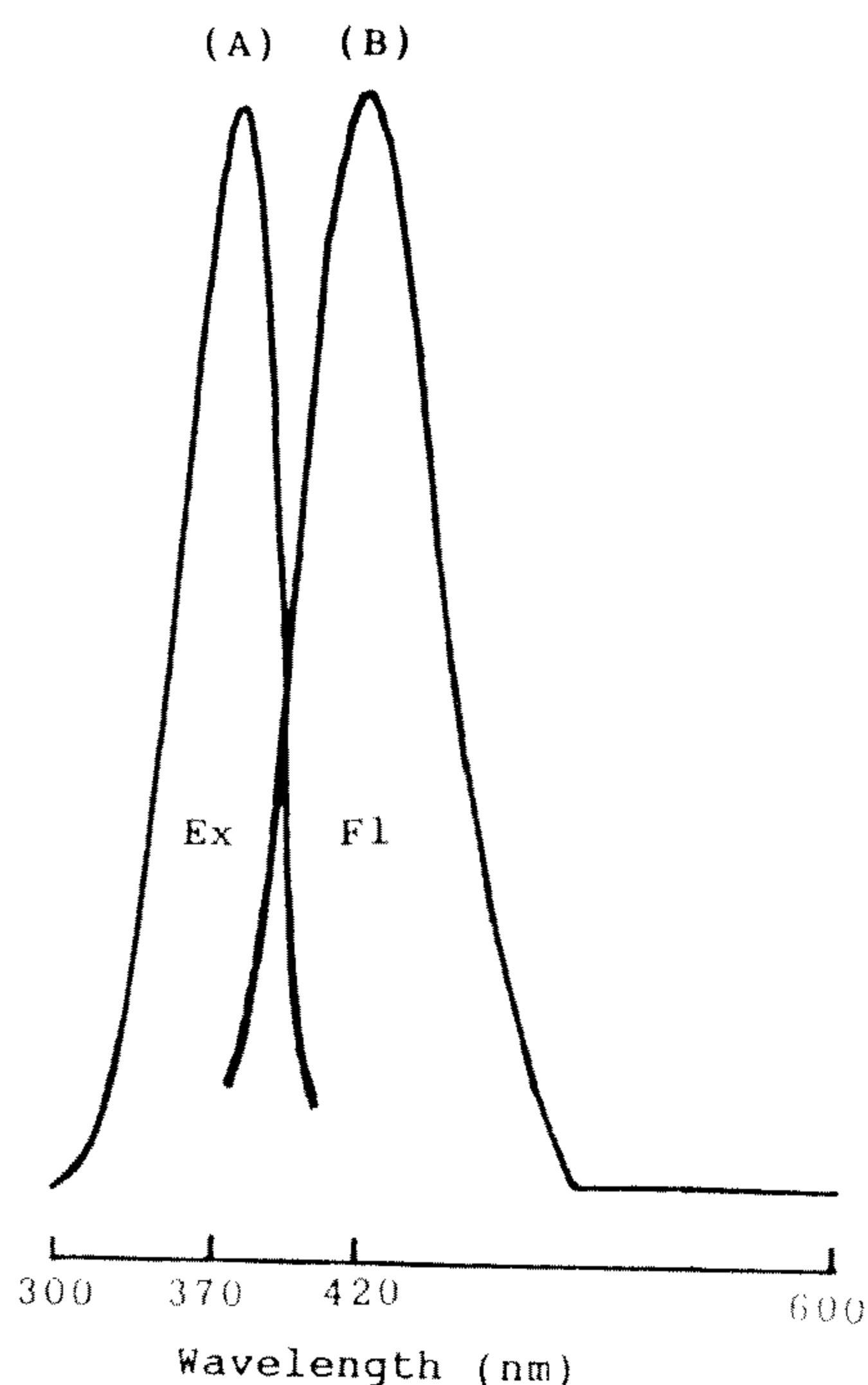


Figure 1. Fluorescence spectra of thiochrome;
(A)excitation spectrum at 370 nm;
(B)emission spectrum at 420 nm.

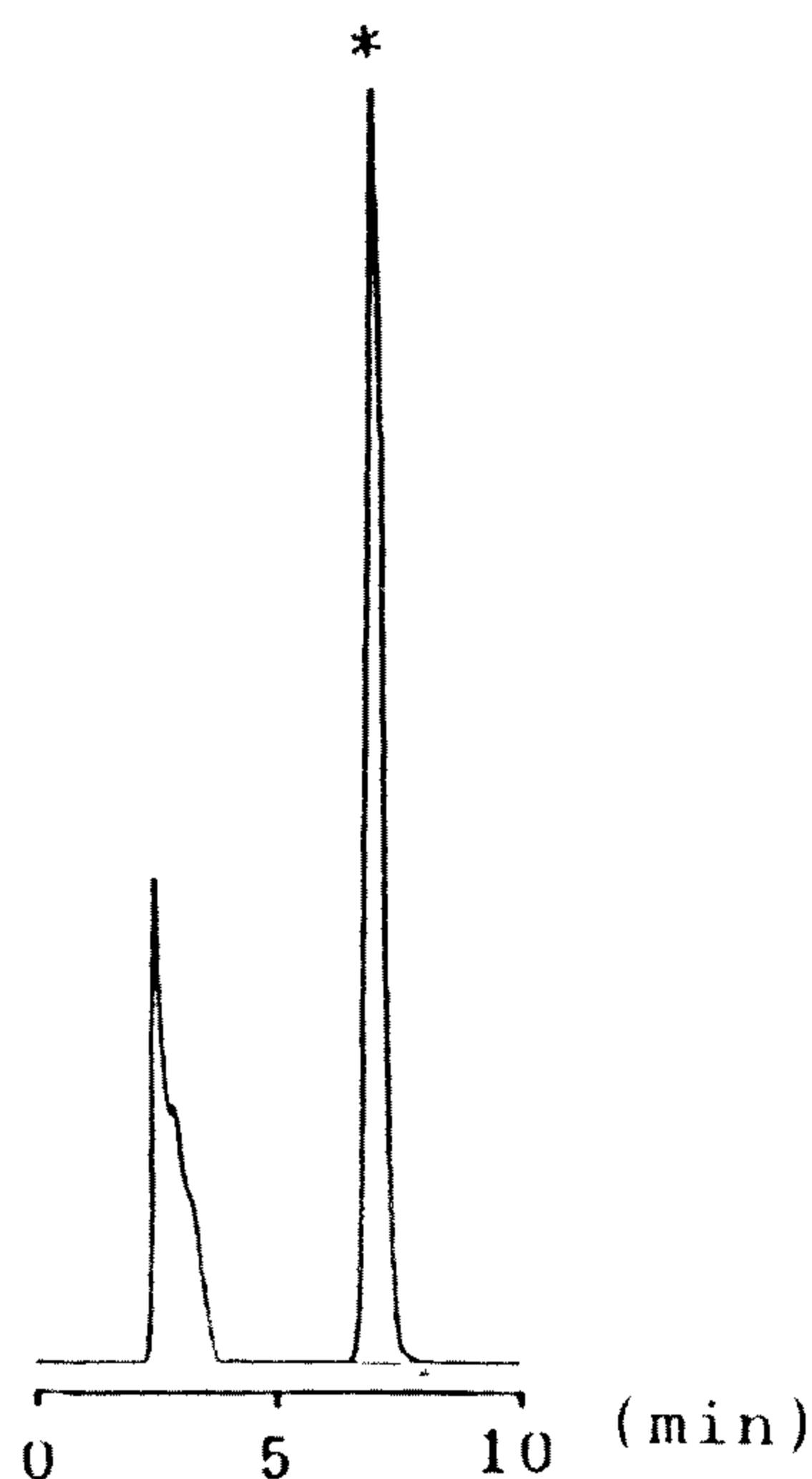


Figure 2. Typical fluorimetric HPLC chromatogram of TLS standard ($15.3\mu\text{g}/\text{ml}$).

取 $9.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 TC1(相當於 TLS $23.0\mu\text{g}/\text{ml}$)5ml 與本節所述取 $23.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 TLS 5ml 同樣操作,發現結果一致,因此應該可以省略加熱分解之步驟。

(五)反應條件之探討

1.NaOH 濃度之影響

文獻資料大部分都採用含 1% 鐵氰化鉀之 15% NaOH 溶液當作反應劑^(5,6,8-11),為了解 NaOH 濃度對反應之影響,分別配製含 1% 鐵氰化鉀之 5、10、15、17、20 及 22% NaOH 溶液。取 $23.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 TLS 5ml 加 0.1N 鹽酸定容至 100ml,再取此液 5ml,分別加入不同濃度之 NaOH 反應液 5ml。以下按照一.(四)節所述同樣操作,結果(見圖三)以 20% NaOH 反應所得之 thiochrome 生成量最高,因此採用含 1% 鐵氰化鉀之 20% NaOH 溶液當作氧化反應液。

2.反應時間及添加磷酸之影響

Fellman 取經酵素處理所得之檢液 10ml,加含 1% 鐵氰化鉀之 15% NaOH 溶液 5ml,立刻加磷酸 0.5ml 中和⁽⁸⁾,Fernando 等於檢液 2.5ml 中加反應液 2.5ml,放置 45 秒後,加磷酸 0.375ml⁽⁹⁾。本實驗取 $23.0\mu\text{g}/\text{ml}$ 之 TLS 溶液按照上述探討之方法,測試不同反應時間對 thiochrome 生成之

影響,結果(見圖四)反應 0、1 及 2 分鐘等三種時間所得之結果並無差異,但 3 分鐘以後,反應生成物就漸漸被分解,因此本實驗決定反應時間為 1 分鐘。

接著比較加與不加磷酸的影響,結果(見圖四)亦是 3 分鐘後生成物開始消退,而加磷酸之生成量皆比不加磷酸者高 1~2%,強鹼既可能使 thiochrome 分解為 thiamine disulfide,又對層析管造成不良影響,因此以加磷酸中和為宜。

3. 萃取時間及方式

以 1、2 及 3 分鐘等不同萃取時間進行探討,結果並無差異,將離心瓶改以分液漏斗振盪時,效果也一樣,因此反應時置於離心瓶中萃取 1 分鐘。

4. 稀釋倍數對添加回收之影響

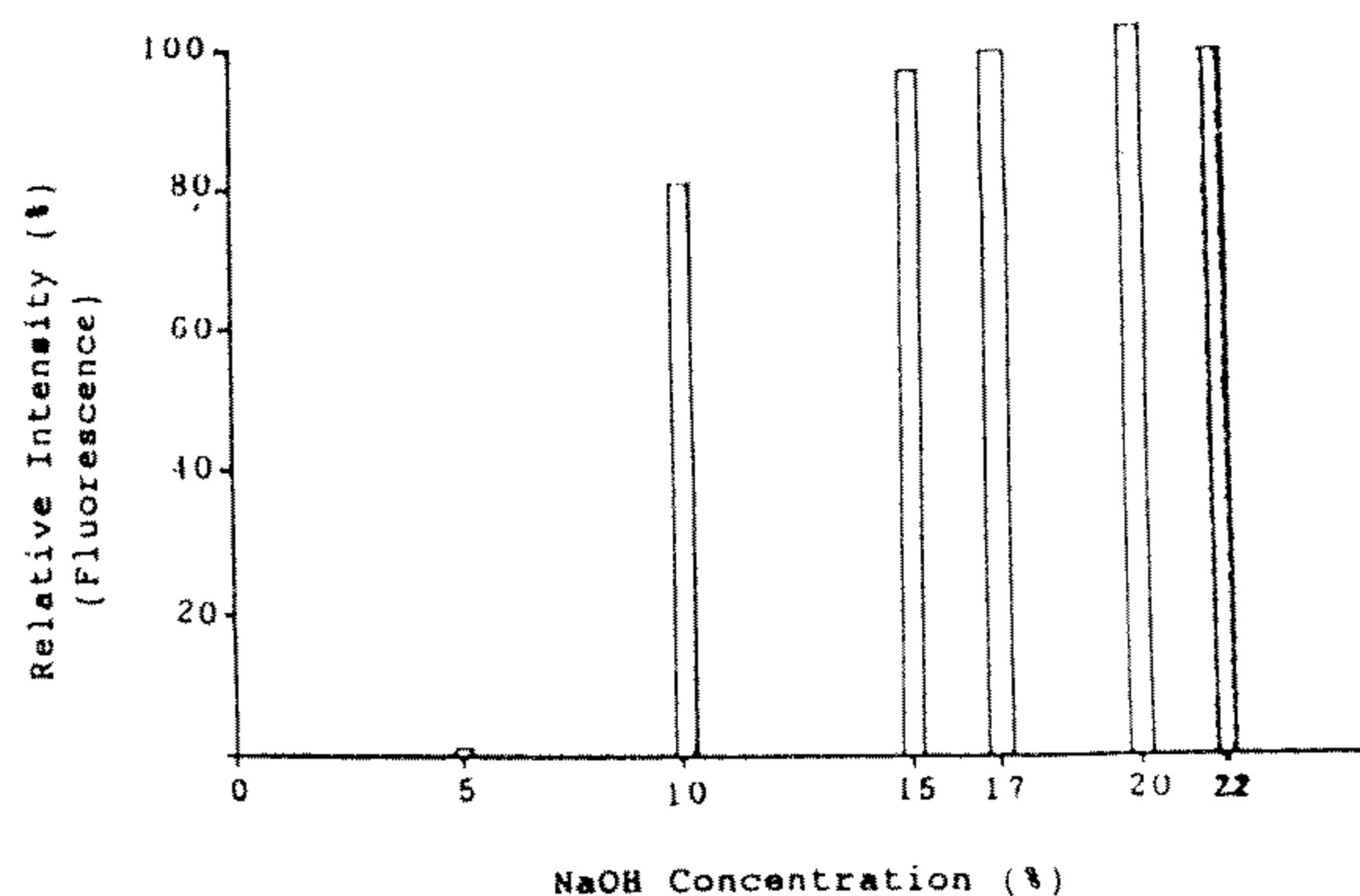


Figure 3. Effect of NaOH concentration on thiochrome derivative formation.

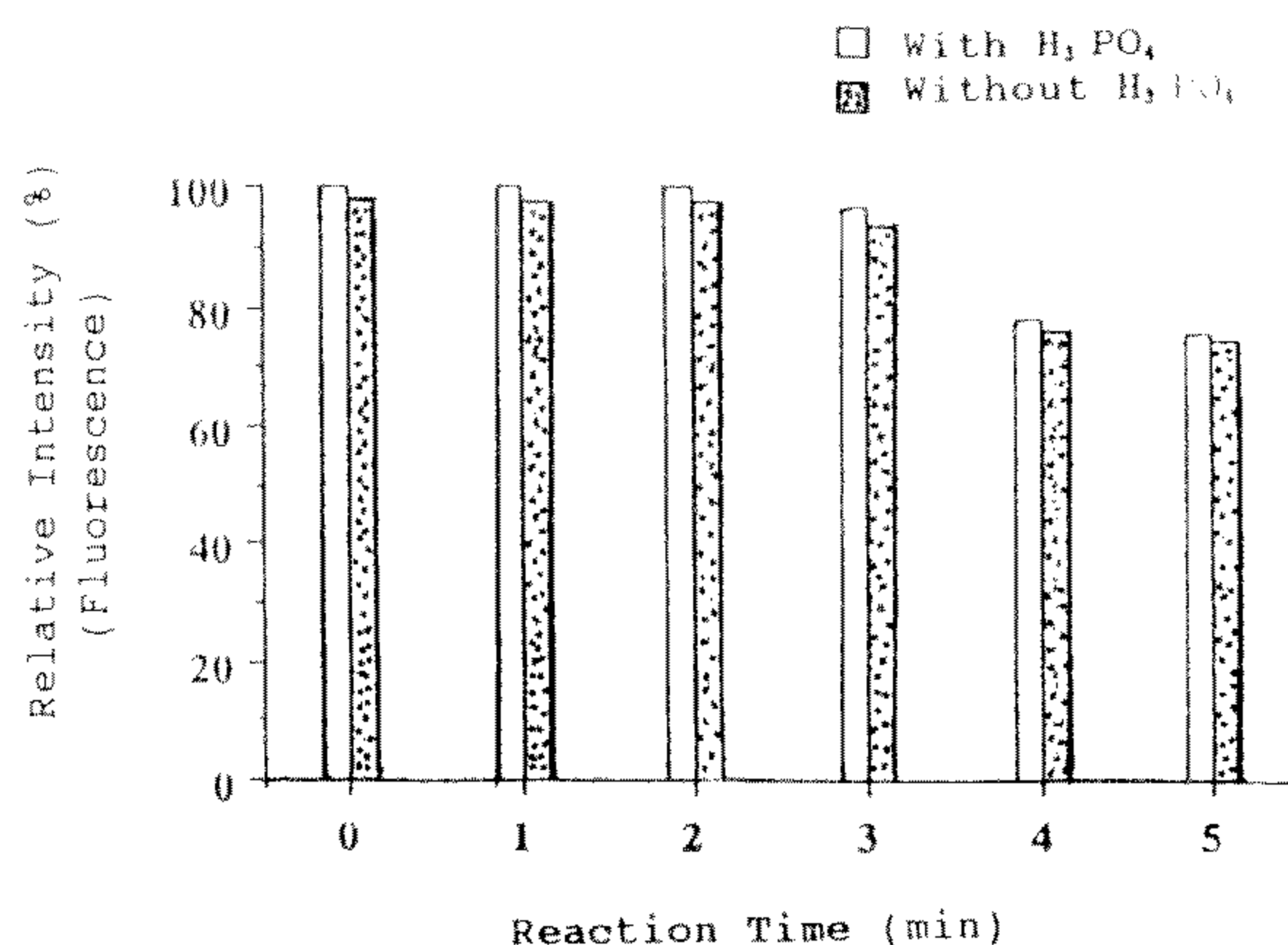


Figure 4. Effect of reaction time and H₃PO₄ on thiochrome derivative formation.

取檢體 5ml,添加 23.0 μ g/ml 之 TLS 標準溶液 5ml,依本實驗建立之方法進行回收試驗,結果(如表一)回收率只有 75.28%,經過 taka-diestase 酵素處理,情況亦未見改善。另測試檢體稀釋倍數對添加回收之影響。取醬油檢體 1ml 加 23.0 μ g/ml 之 TLS 1ml,以 0.1N 鹽酸稀釋成 20、25、50 及 100ml,每一稀釋度作三重覆,結果(如表一)回收率分別為 75.28、78.20、83.54 及 92.05%,因此決定取檢體 1ml 稀釋至 100ml,進行本實驗,為了提高偵測值,取檢液 50 μ l 注入液相層析儀。

(六) 檢量線之製作

圖五所示為依前述檢量線繪製方法所得之檢量線,其線性回歸係數 $r = 0.9998$ 。

(七) 添加回收試驗

以本實驗建立之方法進行 4.6、7.7、15.3、18.4 及 23.0ppm 添加量之回收試驗,每一添加量作五重覆,所得回收率(如表二)分別為 91.57、91.99、92.45、92.53 及 92.45%,其變異係數皆小於 5%。圖六即為醬油檢體中添加 15.3 ppm TLS (相當於 LS 10 ppm)之螢光檢測液相層析回收圖譜。

二、十二烷基硫酸鹽(LS)

LS 之檢驗方法有 methylene blue 比色法^(2,5)、Co-PADAP 比色法⁽⁵⁾、azure A 比色法⁽⁶⁾及滴定法⁽¹²⁾等,據日本衛生試驗法記載,測定水質中陰離子界面活性劑時,Co-PADAP 比色法比 methylene blue 比色法操作簡便,感度也較高⁽⁵⁾,唯經本實驗測試結果,因醬色干擾,無法利用 Co-PADAP 比色法予以檢驗。滴定法係 LS 在 pH3 下,與 azureA 結合成藍色物質,以氯仿抽出後,用 cetyldimethylbenzyl ammonium chloride(CDBAC)

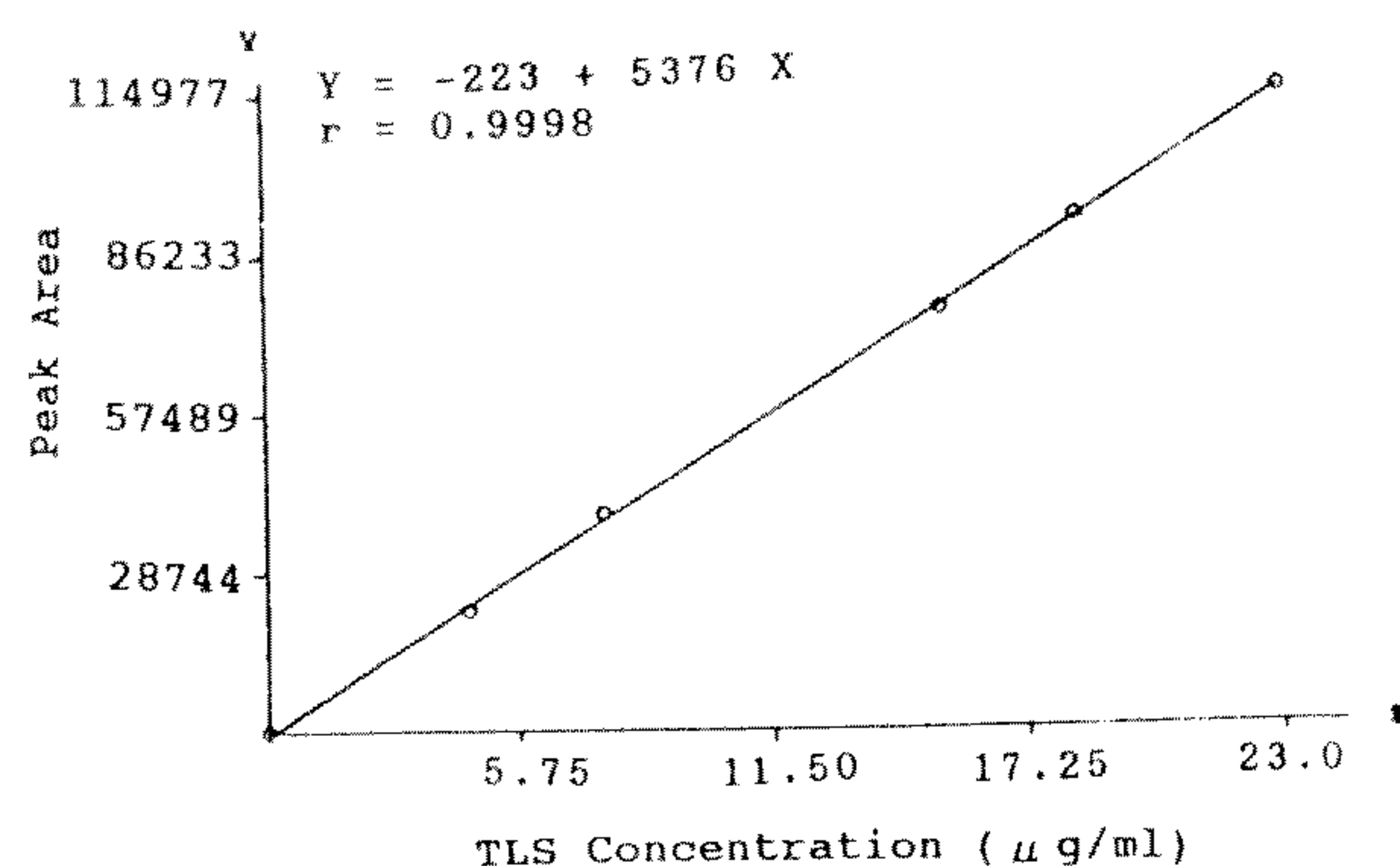


Figure 5. Calibration curve of TLS with fluorimetric HPLC method.

Table 1. Recovery of TLS standard (23.0 ppm) addition on soy sauce at serious of dilution by fluorimetric HPLC method.

Dilution	Recovery ^a (%)
100	92.05(1.04) ^b
50	83.54(3.52)
25	78.20(3.20)
20	75.28(3.54)

^a Average of three determinations.
^b Number in parenthesis is the coefficient of variation(CV, %).

Table 2. Recovery of TLS fortification into soy sauce with fluorimetric HPLC method.

Fortification Level (calculated as LS, ppm)	Recovery ^a (%)
3	91.57(3.61) ^b
5	91.99(1.80)
10	92.45(3.06)
12	92.53(1.70)
15	92.45(3.45)

^a Average of five determinations.
^b Number in parenthesis is the coefficient of variation(CV, %).

Table 3. Effect of chloroform Washing (to remove impurity) on absorbance of MB and AA.

Washing Volume (ml)	No. of Washing	Absorbance(O.D.)	
		MB(650nm)	AA(640nm)
10	1	0.225	0.008
5	2	0.055	0.003
5	3	0.035	0.003
5	4	0.026	0.003

滴定至氯仿層呈無色後,滴加 methyl orange,再繼續以 CDBAC 滴定至氯仿層呈黃綠色,此滴定法亦受醬色干擾。因此選定 methylene blue 比色法(MB 法)及 azureA 比色法(AA 法)進行探討。
(一)MB 及 AA 比色法之比較
兩種方法之原理都是將陰離子界面活性劑與鹽基性色素結合,再以有機溶媒抽出。MB 中含有氧化生成物 ethylene azure A 之不純物質⁽⁵⁾,使用

前必須於鹼性下,以氯仿洗淨去除,實驗顯示(見表三)先後以氯仿 10、5、5 及 5ml 振盪清洗 MB,氯仿層分別收集,於 650nm 測吸光值,結果第三次及第四次清洗液仍有 0.035 及 0.026 之吸光值。為了瞭解 AA 是否亦有干擾物存在,於 pH3 下,以氯仿清洗,分段測試,結果(見表三)吸光值介於 0.008~0.003 之間,幾乎無干擾。再者 AA 之分層速率比 MB 快,與 Wang⁽¹²⁾之報導相符,故本實驗

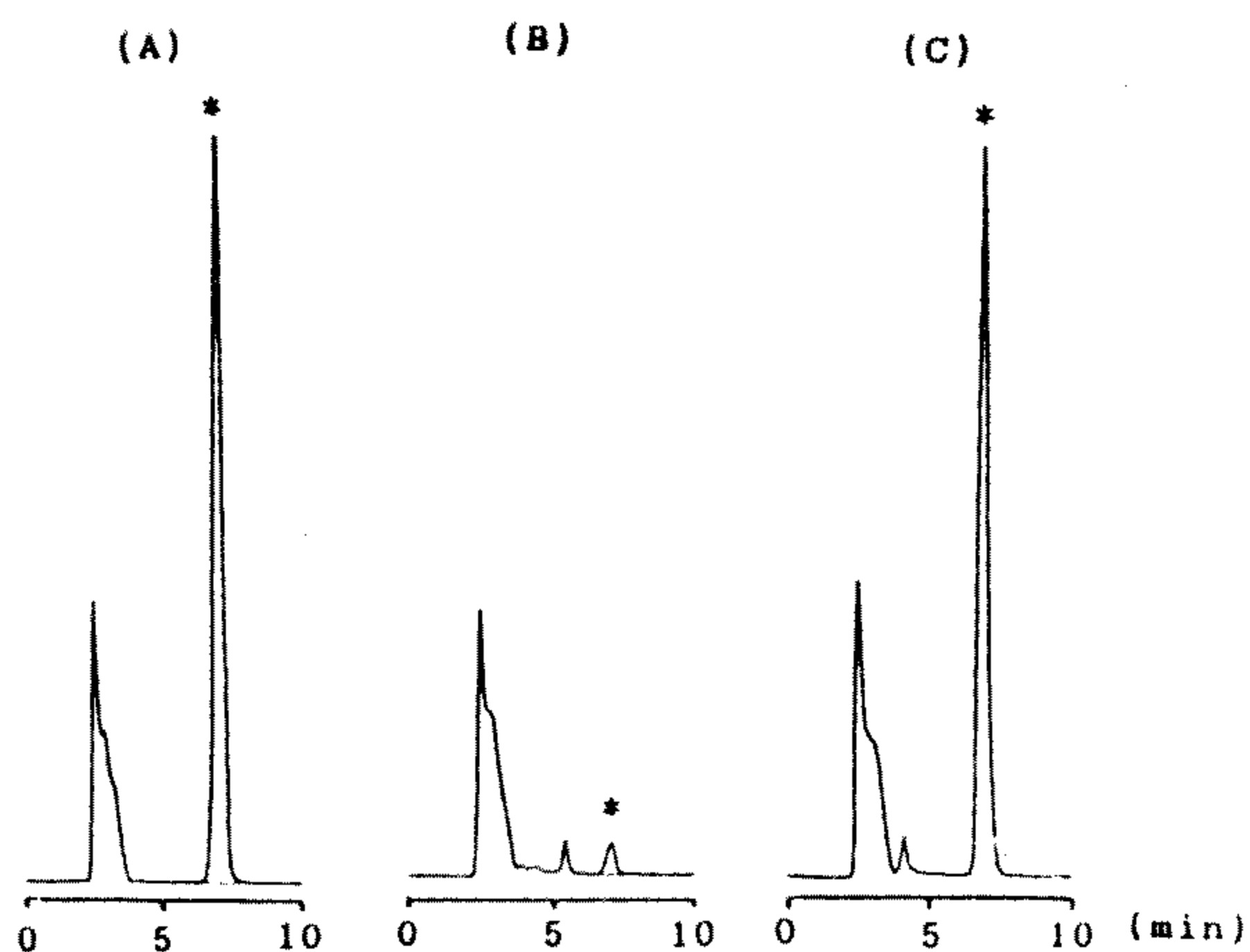


Figure 6. Fluorimetric HPLC chromatograms of
(A) standard solution of 15.3 µg/ml TLS;
(B) blank sample of soy sauce;
(C) soy sauce spiked with 15.3 ppm TLS.

採用 AA 比色法分析。

(二)萃取之分析比較

MB 法係於分液漏斗 A 中,在鹼性硼酸緩衝液下,以氯仿除去 MB 之雜質,水層加檢體及氯仿,振盪萃取,另取分液漏斗 B,同前述方法去雜質後,水層加 1N 硫酸,再將分液漏斗 A 之氯仿層移入,振盪萃取,所得之氯仿層於 650 nm 測吸光值。AA 法則於 pH 3 下,加 azure A 溶液,以氯仿萃取後於 640 nm 處測定。AA 法比 MB 法簡便,取檢體 10ml,加 1N 硫酸 3ml 及 azure A 溶液 1ml,調整 pH 至 3,經試驗結果,AA 法因受醬色干擾,導致氯仿層亦呈淡藍色,,為了除去此干擾,曾參考 AOAC Official Methods of Analysis 加 benzethonium chloride 當作空白試驗⁽⁶⁾,結果仍不理想。改採用 MB 法二次萃取方式,將分液漏斗 A 萃取所得之氯仿層移入分液漏斗 B 中,與第一次同樣條件再萃取,得相當滿意之結果。

分別取 15.3ppm 之 TLS 標準溶液 10ml,依照 MB 法及本實驗所建立之 AA 法進行氯仿萃取之探討,每次 15ml,萃取四次,結果(見表四)MB 法之萃取率為 90.42、8.65 及 0.92%,AA 法為 93.98、5.31 及 0.71%,顯示 AA 法比 MB 法之萃取效果好,且前兩次即萃取 99% 以上,因此本實驗以每次 20ml 萃取二次,經脫脂棉過濾後,加氯仿定容至 50ml。有些檢體萃取時,易產生乳化作用,靜置時間需較久,必要時氯仿層需離心。

(三)檢量線之製作

圖七所示為依前述檢量線繪製方法所得之檢量線,其線性回歸係數 $\gamma = 0.9998$ 。

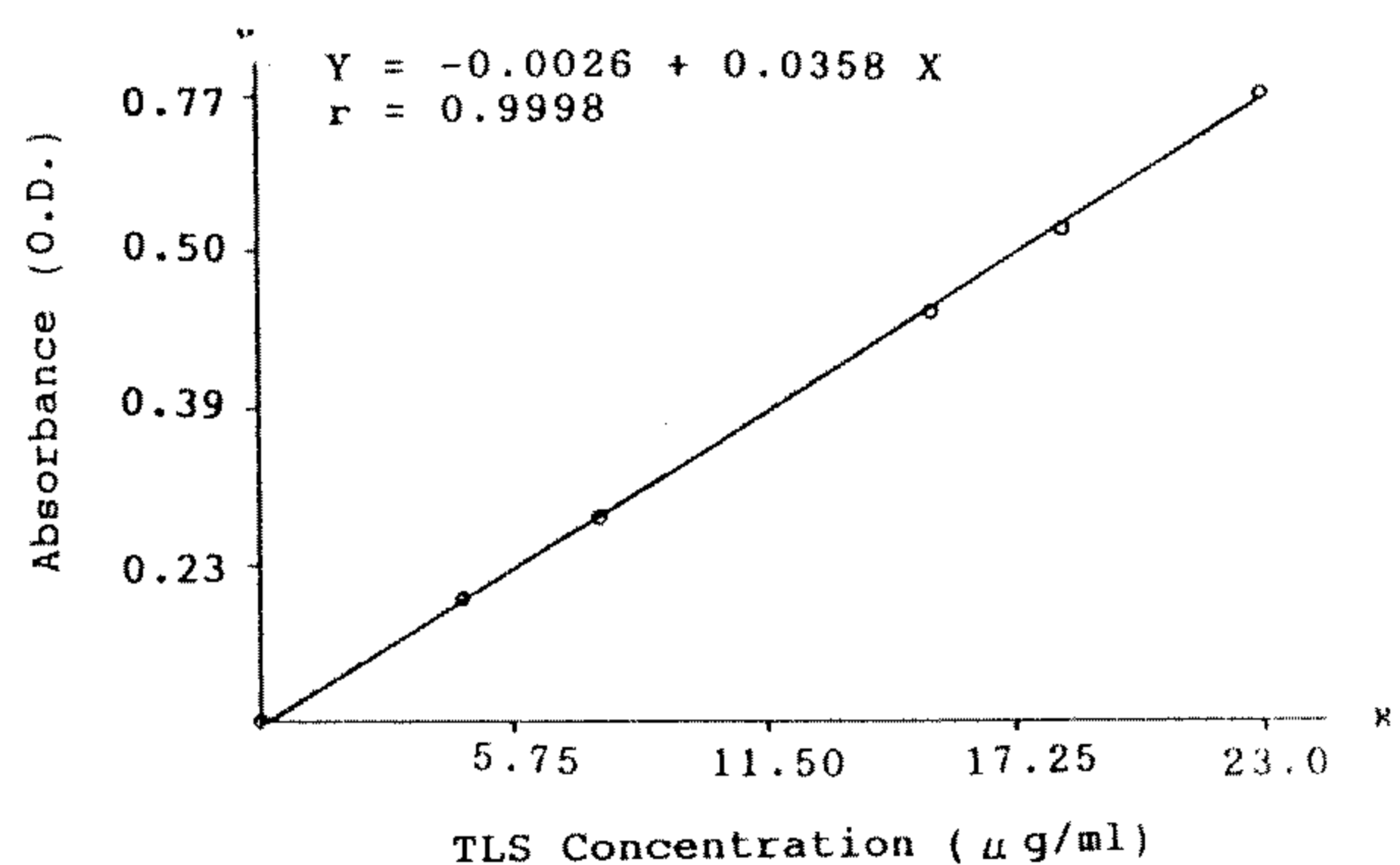


Figure 7. Calibration curve of TLS with Azure A colorimetric method.

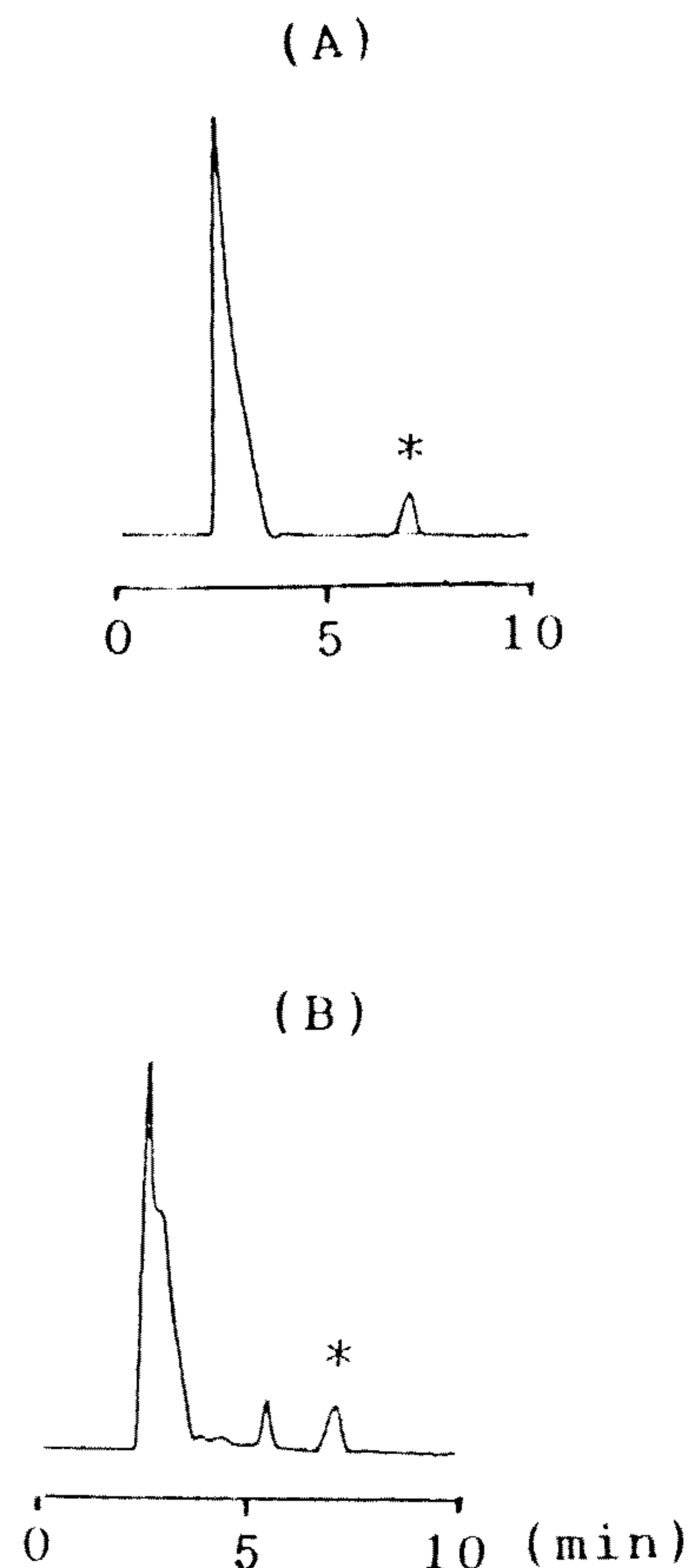


Figure 8. Fluorimetric HPLC chromatograms of the detection limits.
(A) TCl solution of 0.29 µg/ml;
(B) soy sauce sample with detectable trace of TCl.

(四)添加回收試驗

分別以本實驗建立之 AA 法及 MB 法進行 4.6、7.7、15.3、18.4 及 23.0ppm 之 TLS 添加量 (相當於 LS 3、5、10、12 及 15ppm)之回收試驗,每一添加量作五重覆,所得回收率(如表五)AA 法為 98.04、98.89、98.45、98.51 及 98.22%,MB 法 92.69、98.91、96.65、95.04 及 96.74%,兩方法之變異係數皆小於 5%,AA 法省略了去雜質之清洗步驟,分層速率又較快,實為一較經濟簡便之方法。

三、檢出限量及偵測極限

隨著精密儀器之發展,感度越來越高,使得偵測極限越來越低,醬油中天然存在之維生素 B₁,可以說微乎其微,然依本實驗之方法進行檢驗時,幾乎都有檢出,絕大部分檢出量約 0.2ppm 左右,經酵素處理者,結果仍是一樣,為了慎重起見,請醬油製造廠提供純釀造醬油檢體 3 件,分析結果分別檢出維生素 B₁ 0.87、0.78 及 0.69ppm,可見市售醬油中應存在微量之天然維生素 B₁。以 0.29μg/ml 之 TCl 溶液(相當於檢體中含 TLS 0.7 ppm)進行測試,結果(見圖八)層析圖譜所得之面積與檢出微量者相近,因此維生素 B₁ 之檢驗以 TLS 0.7ppm 以下為未檢出,偵測極限為 0.2ng。

Table 4. Comparison of extraction ratio between MB and AA method on fortified TLS standard (15.3ppm) of soy sauce.

CHCl ₃ volume (ml)	No. of Extraction	Extraction Ratio ^a (%)	
		MB Method	AA Method
15	1	90.42(2.37) ^b	93.98(1.72) ^b
15	2	8.65(14.91)	5.31(6.11)
15	3	0.92(25.56)	0.71(8.45)
15	4	0(0.00)	0(0.00)

^a Average of three determinations.
^b Number in parenthesis is the coefficient of variation (CV, %).

Table 5. Recovery of TLS fortified soy sauce sample with authorial AA method and MB method.

Method	Fortification Level (calculated as LS, ppm)	Recovery ^a (%)
AA Method (640nm)	3	98.04(2.67) ^b
	5	98.89(3.72)
	10	98.45(1.40)
	12	98.51(1.68)
	15	98.22(0.78)
MB Method (650nm)	3	92.69(2.54)
	5	98.91(1.88)
	10	96.65(1.15)
	12	95.04(2.48)
	15	96.74(1.58)

^a Average of five determinations.
^bNumber in parenthesis is the coefficient of variation(CV, %).

Table 6. Comparison of flourimetric HPLC method and AA method on TLS contents (ppm) of soy sauces obtained from markets.

Sample No.	Nationality	Flourimetric HPLC method	AA Method
6	Japan	15.59 (6.45)	16.14 (10.51)
7	Japan	15.57 (6.44)	15.89 (10.35)
11	Japan	17.90 (7.41)	19.35 (12.60)
21	Japan	1.61 (0.67)	1.61 (1.05)
28	Japan	2.16 (0.89)	6.40 (4.17)
29	Japan	1.03 (0.43)	3.59 (2.34)
34	Japan	17.72 (7.33)	18.03 (11.74)
35	Japan	7.43 (3.07)	6.26 (4.08)
61	Taiwan	2.10 (0.87)	N.D. (N.D.)
62	Taiwan	1.88 (0.78)	N.D. (N.D.)
63	Taiwan	1.67 (0.69)	N.D. (N.D.)

^aNumber in parenthesis is the TCl content (ppm).

^bNumber in parenthesis is the LS content (ppm).

AA 比色法受醬油干擾之吸光值介於 0.01~0.02 之間, 0.49 μ g/ml 之 SLS 溶液(相當於檢體中含 TLS 0.7ppm)之吸光值為 0.024, 因此 AA 比色法亦以 TLS 0.7ppm 以下視為未檢出, 偵極限為 0.014 μ g/ml。

四、市售醬油檢體中TLS之含量調查

由全省抽購醬油檢體, 國產 27 件, 日本進口 36 件, 共計 63 件。其檢測結果及防腐劑標示詳見表六。以 AA 法分析, 經與 TLS 檢量線比對, 國產品全部未檢出 TLS, 進口檢體檢出 8 件, 其中檢體編號 6、7、11、34 及 35 五件丸金醬油株式會社製造之檢體檢出 TLS 6.26~19.35ppm(相當於 LS 4.08~12.60ppm), 均標示不含防腐劑, 其餘編號 21、28 及 29 三件檢體檢出 TLS 1.61~6.40ppm(相當於 LS 1.05~4.17ppm)。螢光法檢測時, 國產品有 3 件(均為釀造醬油)雖可算出相當於 TLS 1.67~2.10ppm, 但以 AA 法檢測時, 則均未檢出, 顯見該 3 件檢體所含者為維生素 B₁, 而非 TLS。進口檢體之檢出情形則與 AA 法一致, 均為 8 件, 其中丸金醬油株式會社製造之 5 件檢體檢出 TLS 7.43~17.90ppm(相當於 TCl 3.07~7.41ppm), 其餘 3 件檢出 TLS 1.03~2.16ppm(相當於 TCl 0.43~0.89ppm)。結果顯示, 兩種方

法所測得之數據幾乎一致。唯編號 28 及 29 兩件(皆為燒肉醬), 所測得之數據差異較大。本調查結果有 4 件超過『食品添加物使用範圍及用量標準』中以 laurylsulfate 計 10ppm 以下之規定。

參考文獻

- 1.食品添加物公定書解說書編輯委員會.1987.日本食品添加物公定書第五版:pp.D614-616.
- 2.中島隆, 宇佐見博, 奥原章.1978.醬油中に添加されたチアミンアルキル硫酸鹽の定量. 醬研.4(4):137-141.
- 3.行政院衛生署.1990.食品添加物使用範圍及用量標準.79.2.19 衛署食字第 857858 號公告.
- 4.Voss, H. and Piendl, A. 1976. Quantitative Microbiological Determination of B-Vitamins in Beer and Yeast. Brewers'-Digest.51(10): 56-58.
- 5.日本藥學會.1990.水溶性ビタミンの理化學的試験.陰イオン 界面活性劑.日本衛生試験法注解.pp.356-361, pp.991-994.金原出版株式會社.東京.
- 6.AOAC. 1984. Chapt. 20. Sodium Lauryl Sul-

- fate in Egg White. Chapt. 43 Thiamine in Foods. In "AOAC Official Methods Of Analysis". pp.396-397, pp.836-838. Williams, S. (ed). Assoc. Off. Anal. Chem. Washington, D.C. U.S.A.
7. Ishii, K., Sarai, K., Sanemori, H. and Kawasaki, T. 1979. Analysis of Thiamine and Its Phosphate Esters by High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Biochem.* 97: 191-195.
8. Fellman, J. K., Artz, W. E., Tassinari, P. D., Cole, C. L. and Augustin, J. 1982. Simultaneous Determination of Thiamine and Riboflavin in selected Foods by High Performance Liquid Chromatography. *J. of Food Sci.* 47: 2048-2050.
9. Fernando, S. M. and Murphy, P. A. 1990. HPLC Determination of Thiamine and Riboflavin in Soybean and Tofu. *J. Agric. Food Chem.* 38:163-167.
10. Kimura, M., Fujita, T., Nishida, S. and Itokawa, Y. 1980. Differential Fluorimetric Determination of Picogram Levels of Thiamine, Thiamine Monophosphate, Diphosphate and Triphosphate Using High Performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.* 188:417-419.
11. Mauro, D. J. and Wetzel, D. L. 1984. Simultaneous Determination of Thiamine and Riboflavin in Riched Cereal Based Products by High Performance Liquid Chromatography Using selective Detection. *J. Chromatogr.* 299:281-287.
12. Wang, L. K. and Panzardi, P. J. 1975. Determination of Anionic Surfactants with Azure A and Quaternary Ammonium Salt. *Anal. Chem.* 47(8):1472-1475.

Studies on Analytical Method of Thiamine Dilaurylsulfate in Soy Sauce

SHU-JU SU, CHUN-KUO YU, SHU-CHI LEE, CHAO-HONG LIU AND SHIN-SHOU CHOU

National Laboratories of Foods and Drugs, Department of Health, Executive Yuan

ABSTRACT

The methods for the determination of thiamine dilaurylsulfate (TLS) in soy sauce have been developed. TLS is a complex of thiamine hydrochloride (TCl) and sodium lauryl sulfate (SLS). The LS portion was determined by the azure A colorimetric method (AA method). Azure A solution and IN sulfuric acid were added to the sample, LS was extracted with chloroform, and then detected at 640nm. The TCl portion was determined by the fluorimetric HPLC method. TCl was converted to its fluorescent derivative, thiochrome, by adding 1% potassium ferricyanide in 20% sodium hydroxide to diluted sample, and neutralizing with phosphoric acid. The thiochrome thus formed was extracted it

with isobutanol and then determined by HPLC. Recovery studies of TLS were performed at 3, 5, 10, 12 and 15 ppm (calculated as LS) fortification levels in the samples with both methods. Average recoveries were 98.04~98.89% with the AA method and 91.57~92.53% with the fluorimetric HPLC method. Coefficients of variation were less than 5%. The limits of detection of both methods were 0.7 ppm.

Twenty-seven domestic and thirty-six imported soy sauce samples were analyzed. No TLS was detected in domestic samples, while eight imported samples were found positive for TLS. The data obtained with both methods were practically identical.

Key words: Thiamine dilaurylsulfate (TLS), Sodium lauryl sulfate (SLS), Azure A colorimetric method, Fluorimetric HPLC.

