

醬油中果糖酸之檢驗方法建立

蔡沁玓 吳白玟 林汝青 高雅敏 曾素香 王德原

食品藥物管理署研究檢驗組

摘要

速釀法製造醬油是在高溫100 - 130°C下，以鹽酸水解黃豆粉或黃豆片等植物蛋白，在水解過程中，原料中的醣類與酸反應會產生果糖酸。釀造醬油是利用微生物發酵，不會產生果糖酸，因此果糖酸之存在與否可用來判斷釀造醬油是否摻雜速釀醬油。本研究利用氣相層析儀搭配火焰離子偵檢器進行分析，層析管柱使用DB-FATWAX UI毛細管柱(內膜厚度0.25 μm，內徑0.25 mm × 30 m)，載氣為氦氣，流速1.8 mL/min，注射器溫度240°C，偵檢器溫度260°C，分流比10:1。以庚酸作為內部標準品，前處理以乙醚為萃取溶劑，乙醚萃取液濃縮後以乙腈定容。確效結果：添加低、高濃度分別為0.025及0.05%，在同日間之平均回收率分別為102.3及102.1%，變異係數為0.3及0.5%；異日間之平均回收率分別為100.1及97.5%，變異係數為0.2及0.3%，定量極限為0.0025%，符合食品化學檢驗方法之確效規範。以本研究方法執行市售醬油產品中果糖酸含量調查，24件檢體中有22件標示為釀造醬油，2件未標示釀造醬油之檢體中，1件檢出果糖酸含量0.64%，其餘檢體均未檢出果糖酸。

關鍵詞：果糖酸、醬油、氣相層析儀、火焰離子檢出器

前言

一、醬油

醬油為源自於中國的液體調味料，顏色為淺棕色至黑色，帶有鹹味和濃郁的鮮味⁽¹⁾，由於其獨特的味道和香氣，在日本、中國、韓國、臺灣和其他亞洲國家作為主要的調味料，並且在西方國家也愈來愈受歡迎⁽²⁾。傳統製程上，醬油需經過數個月的微生物發酵，主要原料為黃豆及小麥，先經過固態發酵混合米麴菌(*Aspergillus oryzae*)或醬油麴黴(*Aspergillus sojae*)製麴，再進行鹽水發酵，經長時間約3至6個月的發酵及熟成，產生具特殊風味的製品^(2, 3)。然而為方便大量生產，降低生產成本，

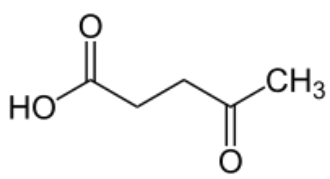
並縮短生產所需的時間，同時獲得更穩定的品質，通過酸水解製備醬油，將大豆粉和小麥的混合物以鹽酸加熱12至16個小時即可得到高濃度的胺基酸水解液，再以50%氫氧化鈉調整pH至4 - 5。製備好的醬油裝瓶前先放置在儲桶中進行熟成，其最終鹽濃度為18%⁽⁴⁾。在CNS 423⁽⁵⁾中，醬油的定義為「以植物性蛋白質為原料，經釀造法、速釀法及混合法製得之調味液，得稱之為醬油」，包括添加食鹽、糖類、酒精、調味料、防腐劑等製造而成者。釀造法係以大豆、脫脂大豆、黑豆及小麥、米等穀類，經蒸煮或其它方法處理並經培養麴菌製成「醬油麴」，或在此加入蒸熟米或蒸熟米以麴菌糖化，並注入食鹽水，或加生醬油、醬油

膠使其發酵、熟成者。速釀法為植物性蛋白質以酸分解或酵素水解處理所得之胺基酸液，經添加醬油膠、生醬油等再發酵熟成者。混合法則是在釀造醬油或速釀醬油中添加酸分解法或酵素水解醬油。其中以酸分解生產之醬油加工過程中會產生果糖酸(Levulinic acid)及某些致癌物質，例如：3-單氯丙二醇(3-monochloro-1,2-propanediol, 3-MCPD)和1,3-二氯丙二醇(1,3-dichloro-2-propanediol, 1,3-DCP)⁽³⁾。

二、果糖酸

果糖酸學名為乙醯丙酸，分子式及化學結構如表一，易溶於醇、醚等有機溶劑。使用酸分解製造之醬油，以鹽酸在高溫100 - 130°C水解黃豆粉或黃豆片等植物蛋白，其中的醣類在水解過程中與酸反應產生果糖酸⁽⁶⁾。而釀造醬油則是利用微生物發酵，不會產生果糖酸。因此，果糖酸的存在與否，可作為宣稱純釀造之醬油是否有摻雜酸分解醬油之判斷依據。根據CNS 423規定，釀造醬油、醬油膏之果糖酸含量不得超過0.1%，釀造薄鹽醬油、淡色醬油之果糖酸含量不得超過0.01%，若果糖酸含量超過上述規定，表示有摻雜化學醬油，非純釀造醬油⁽⁵⁾。果糖酸之毒性低，若醬油中含有超過0.1%果糖酸，對人體健康影響不大⁽⁶⁾。但若該醬油是標榜「純釀造醬油」，則涉嫌摻雜酸分解醬油且標示不實。本篇研究係參考CNS 423醬油中果糖酸之測定方法，更改管柱為DB-FATWAX UI毛細管柱，內膜厚度0.25

表一、果糖酸之學名、分子式及化學結構

學名	Levulinic acid (乙醯丙酸)
分子式	$C_5H_8O_3$
化學結構	

μm ，內徑0.25 mm \times 30 m，並降低移動相流速至1.8 mL/min，作為醬油中果糖酸之鑑別及定量方法，據以檢測釀造醬油是否符合其標示宣稱。

材料與方法

一、試驗樣品

醬油產品14件、薄鹽醬油產品3件、淡色醬油產品4件及醬油膏產品3件，共24件樣品。其中13件購自超市、9件購自網路商城，另2件取自水餃店之醬油包，冷藏儲存備用。使用未檢出果糖酸之醬油作為空白樣品。

二、試藥、標準品及溶劑

鹽酸、乙醚、乙腈及無水硫酸鈉購自J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)。對照用標準品果糖酸(Levulinic acid)，純度97.5%及內部標準品庚酸(Heptanoic acid)，純度99%，皆購自Sigma (St. Louis, MO, USA)。

三、儀器及設備

- (一)高速分散裝置(2010 GenoGrinder[®], SPEX SamplePrep, USA)
- (二)減壓濃縮裝置(Hei-Vap Ultimate Control ML G3, Heidoph, Germany)
- (三)離心機(Allegra[™] 25R Centrifuge, 貝克曼庫爾特有限公司, 臺灣)
- (四)氣相層析儀(Shimadzu GC-2010 FID, 臺灣島津科學儀器股份有限公司, 臺灣)

四、標準溶液之配製

- (一)對照用標準品：取果糖酸約50 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至20 mL，作為標準原液，冷藏儲存。
- (二)內部標準品：取庚酸約50 mg，精確稱定，以乙腈溶解並定容至20 mL，作為內部標準溶液，冷藏儲存。

(三)標準曲線配製：臨用時取適量標準原液與內部標準溶液混合，以乙腈稀釋至5 - 200 µg/mL (含內部標準品濃度50 µg/mL)，供作標準溶液。

五、檢液之調製

將檢體混勻後，取約1 g，精確稱定，置於離心管中，加入內部標準溶液0.1 mL，以鹽酸調整pH值至1 - 2，加入乙醚15 mL，以高速分散裝置於1000 rpm振盪5分鐘後，以3000 ×g離心5分鐘，收集上層(乙醚層)，下層加入乙醚15 mL，重複萃取三次，合併乙醚層，加入適量無水硫酸鈉去除水分，減壓濃縮至微乾，再以乙腈定容至5 mL，經濾膜過濾，供作檢液。

六、氣相層析儀分析條件

檢出器：火焰離子檢出器

層析管：DB-FATWAX UI毛細管柱，內膜厚度0.25 µm，內徑0.25 mm × 30 m

層析管溫度：初溫：120°C，0.5 min
升溫速率：20°C/min
中溫：180°C，10 min
升溫速率：20°C/min
終溫：250°C，10 min

注入器溫度：240°C

檢出器溫度：260°C

注入量：1 µL

分流比：10：1

移動相氣體及流速：氮氣，1.8 mL/min

燃燒用氣體及流速：氫氣，40 mL/min

助燃用氣體及流速：空氣，400 mL/min

七、鑑別試驗及含量測定

精確量取檢液及標準溶液各1 µL，分別注入氣相層析儀中，依第七節條件進行分析。就檢液與標準溶液所得波峰之滯留時間比較鑑別

之，並依下列計算式求出檢體中果糖酸之含量(%)：

$$\text{檢體中果糖酸之含量(\%)} = \frac{C \times V}{M} \times 10^{-4}$$

C：由標準曲線求得檢液中果糖酸之濃度(µg/mL)

V：檢體最後定容之體積(mL)

M：取樣分析檢體之重量(g)

八、方法確效

依據衛生福利部食品藥物管理署公布之「食品化學檢驗方法之確效規範⁽⁹⁾」進行確效試驗，評估本研究檢驗方法之準確度(Accuracy)、精密度(Precision)及定量極限(Limit of quantitation, LOQ)。

(一)標準曲線

6種不同濃度，線性迴歸方程式之相關係數不應低於0.99，檢液中待測物濃度應在標準曲線之線性範圍內。

(二)準確度-添加回收試驗

1. 執行方式

分別添加0.025及0.05%果糖酸標準溶液至空白樣品中，同日間及異日間皆進行5重複試驗，依第六節流程製成檢液，並計算其回收率以評估是否符合規範要求。

表二、準確度之回收率規範

濃度範圍(ppm)	回收率(%)
≥ 100	85 - 100
>10 - 100	80 - 115

2. 回收率計算方式

$$\text{回收率(\%)} = \frac{\text{測試值}}{\text{添加值}} \times 100$$

(三)精密度-重複性及中間精密度試驗

1. 執行方式

分別添加0.025及0.05%果糖酸標準溶液至空白樣品中，同日間及異日間皆進行

5重複試驗，依第六節流程製成檢液，並計算其變異係數以評估是否符合規範要求。

表三、重複性及中間精密度之變異係數(CV, %)規範

濃度範圍(ppm)	變異係數(CV, %)	
	重複性	中間精密度
≥1	10	14

2. 變異係數計算方式

$$\text{變異係數 (CV, \%)} = \frac{\text{標準偏差(STDEV)}}{\text{添加值}} \times 100$$

標準偏差(Standard deviation, STDEV)

(四) 定量極限之評估

分別將適當濃度之果糖酸標準溶液添加至空白樣品中，經前處理後層析圖譜中待測物波峰之訊號/雜訊比 ≥ 10 ，以及評估含有已知量待測物之低濃度樣品其回收率及重複性是否符合規範要求。

十、統計分析

平均值(Mean)、標準偏差(STDEV)及CV%等數值以Microsoft Excel 2010軟體進行計算。

結果與討論

一、方法之精進修正

本研究方法係參考CNS 423第6節「醬油中果糖酸之測定」⁽⁵⁾，因考量載氣流量而使用與CNS 423中Alltech AT-WAX管柱具有相同固定相之同級品DB-WAX毛細管柱進行分析，但果糖酸在此管柱有拖尾之情形，另以DB-FATWAX UI毛細管柱，不但可減少移動相氣體之使用量，且所得果糖酸之峰形較佳(圖一)。果糖酸標準溶液200 $\mu\text{g/mL}$ 分別經DB-FATWAX UI管柱及DB-WAX管柱之波峰 tailing factor分別為1.25及5.08。

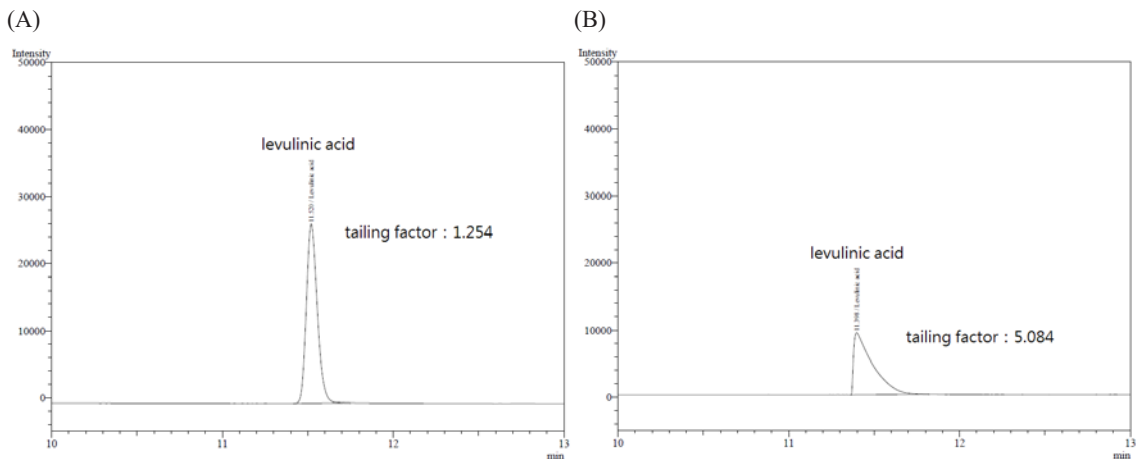
二、確效試驗

(一) 標準曲線

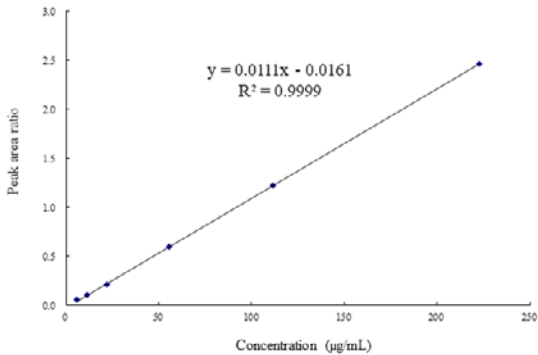
果糖酸之線性範圍為5 - 200 $\mu\text{g/mL}$ ，以庚酸作為內標校正， R^2 均可達0.995以上，顯示線性良好，如圖二。

(二) 準確度-添加回收試驗

於空白基質中添加低、高濃度分別為0.025及0.05%之果糖酸，同日間平均回收率分別為102.3及102.1%，異日間平均回



圖一、果糖酸標準溶液(200 $\mu\text{g/mL}$)分別經DB-FATWAX UI管柱(A)及DB-WAX管柱(B)分析之GC圖譜



圖二、果糖酸之標準曲線

收率分別為100.1及97.5%，顯示方法準確度符合確效規範(表四)。

(三)精密度-重複性及中間精密度試驗

於空白基質中添加0.025及0.05%之果糖

表四、果糖酸之方法確效數據

添加濃度 (%)	同日間(n=5)		異日間(n=10)	
	平均回收率(%)	變異係數(%)	平均回收率(%)	變異係數(%)
0.0025	109.0	0.5	114.1	1.5
0.025	102.3	0.3	100.0	0.2
0.05	102.1	0.5	97.5	0.3

酸，同日間變異係數分別為0.3及0.5%；異日間之變異係數分別0.2及0.3%，顯示方法之精密度符合確效規範(表四)。

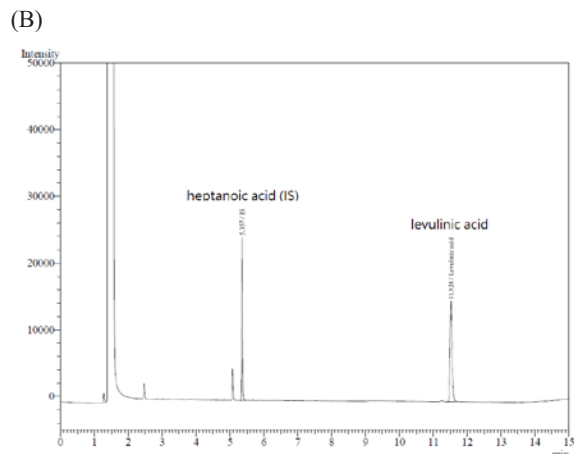
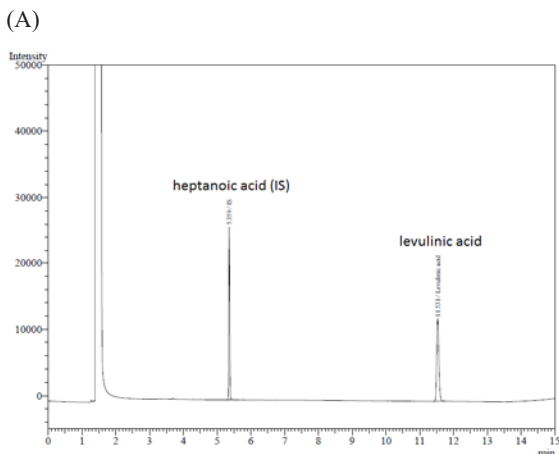
(四)定量極限之評估

添加果糖酸0.0025%於空白樣品(醬油)中進行分析並計算回收率與變異係數，以評估方法之定量極限。結果如表四，同日間果糖酸之平均回收率為109%，變異係數為0.5%，S/N比為22.6；異日間平均回收率114.1%，變異係數為1.5%，S/N比為17.2，皆符合確效規範之要求。

三、市售產品調查

依據CNS423規定，釀造醬油、醬油膏之果糖酸含量不得超過0.1%，釀造薄鹽醬油、淡色醬油之果糖酸含量不得超過0.01%。本研究共計採購24件樣品，包括14件醬油(12件標示釀造醬油、2件無標示)、3件薄鹽醬油、4件淡色醬油及3件醬油膏。檢測結果為1件水餃店之醬油包(未標示釀造醬油)之果糖酸檢測值為0.64%，如圖三，其餘23件樣品均未檢出果糖酸(定量極限為0.0025%)。

結 論



圖三、內標及果糖酸標準品(上機濃度100 ppm)(A)及產品調查中1件檢出果糖酸0.64%(B)之GC圖譜

本研究建立果糖酸之分析方法符合食藥署「食品化學檢驗方法之確效規範」，顯示該方法適用於醬油中果糖酸之檢驗，可作為監測是否為純釀造醬油之參考方法。

參考文獻

1. Steinkraus, K. H. 1983. Handbook of indigenous fermented foods. Marcel Dekker. New York, USA.
2. Devanthi, P. V. P. and Gkatzionis, K. 2019. Soy sauce fermentation: Microorganisms, aroma formation, and process modification. Food Res. Int. 120: 364-374.
3. Sano, A., Satoh, T., Oguma, T. and Nakatoh, A. and *et al.* 2007. Determination of levulinic acid in soy sauce by liquid chromatography with mass spectrometric detection. Food Chem. 105: 1242-1247.
4. Yong, F. and Wood, B. 1974. Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. Adv. Appl. Microbiol, 17: 157-194.
5. 經濟部標準檢驗局。2018。醬油。中華民國國家標準(CNS)總號423類號N5006。[<https://www.cnsonline.com.tw/>]。
6. Tischer, R. G., Fellers, R. C. and Doyle, J. B. 1942. The non-toxicity of levulinic acid. Amer. Pharm. Assoc. 31(7): 217-220.
7. 衛生福利部食品藥物管理署。2013。食品化學檢驗方法之確效規範。102年09月09日第二次修正。[<http://www.fda.gov.tw/tc/includes/GetFile.ashx?id=f636935163435629279&type=2&cid=10975>]。

Development of an Analytical Method for Levulinic Acid in Soy Sauce

CHING-HSUAN TSAI, PAI-WEN WU, NU-CHING LIN, YA-MIN KAO,
SU-HSIANG TSENG AND DER-YUAN WANG

Division of Research and Analysis, TFDA

ABSTRACT

Chemical soy sauce is produced by hydrolyzing the vegetable protein with hydrogen chloride at a high temperature of 100 - 130°C. During hydrolysis, levulinic acid is generated from the reaction of sugar and acid. The presence of levulinic acid in soy sauces indicates adulteration by chemical soy sauce. Gas chromatography was performed on a capillary column, DB-FATWAX UI (30 m×0.25 mm i.d., 0.25 µm film thickness) using helium as the carrier gas with flow rate of 1.8 mL min⁻¹. Injector temperature was set at 240°C with a split injection of 10:1. Detector temperature was set at 260°C. Levulinic acid in sample was extracted with ether, then diluted with acetonitrile after concentration. Heptanoic acid was selected as an internal standard for the accurate quantification of levulinic acid in samples. Accuracy was conducted by spiking 0.025% and 0.05% levulinic acid into blank samples. The average recoveries were 102.3 and 102.1%, and the coefficients of variation were 0.3 and 0.5%, respectively. The limit of quantification was estimated to be 0.0025%. The market survey results of 24 soy sauce samples (22 labeled fermented soy sauce, 2 not claimed) were as follows: one not claimed fermented soy sauce was found containing 0.64% levulinic acid, and the others were not detected.

Key words: levulinic acid, soy sauce, gas chromatograph, flame ionization detector