

國立臺灣海洋大學食品科學系

碩士班專題討論

以HPLC-UV分析果糖酸判定釀造醬油摻假之方法

任課老師：黃意真 老師

宋文杰 老師

指導老師：洪良邦 老師

學 號：10432038

學 生：劉重慶 (5115)

報告日期：106 年 06 月 07 日

內 容 40%	時間掌控 10%	表達能力 30%	投影片 10%	書面資料 10%

指導教授簽名：

以 HPLC-UV 分析果糖酸判定釀造醬油摻假之方法

劉重慶 (5115)

2017/06/07

大綱

- 一、前言
- 二、移動相之組成
- 三、以不同方式萃取水解醬油中果糖酸之含量
- 四、回收率、偵測極限、定量極限及樣品之分析
- 五、結論

摘要

醬油 (soy sauce) 為亞洲飲食文化中最重要之調味料。醬油可依製造過程做分類，如：以食用蛋白經酸水解成的酸水解植物性蛋白 (acid hydrolyzed vegetable protein, acid-HVP) 醬油、釀造數個月製成的純釀造醬油 (naturally brewed soy sauce, NBS) 及以上兩種醬油按比例混合而成的調和醬油 (blended soy sauce)。傳統的釀造醬油製程中不會產生果糖酸，並且果糖酸在醬油中非常穩定，很難透過化學方法去除，使得果糖酸為判斷是否為釀造醬油的可靠指標。本研究發展以高效能液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 搭配紫外光偵測器 (UV detector) 測定醬油中果糖酸 (levulinic acid) 之含量，建立一個快速、簡易操作及高靈敏度之方法，以此判別是否有化學醬油摻入其中或其比例不符合標示之情形。使用 HPLC-UV 及 InertSustain[®] C₁₈ 管柱進行果糖酸層析之最適分析條件為：使用 0.3% 磷酸水溶液：含 0.3% 磷酸之甲醇 = 95：5 (v/v) 進行等位沖提 (isocratic elution)，偵測波長為 268 nm，果糖酸之滯留時間約為 21.17 分鐘。果糖酸檢量線方程式為 $y = 982.9x + 6126.3$ ，其 R^2 值為 0.9997，表示此方法具有良好之線性關係。以不同萃取方式分析水解醬油中之果糖酸含量，液液萃取法以乙酸乙酯 (ethyl acetate) 為萃取溶液，萃取次數三次，可得萃取量 $249 (\pm 5)$ mg/L；蛋白質沉澱法以乙酸鋅 (zinc acetate) 及亞鐵氰化鉀 (potassium hexacyanoferrate (II)) 作為沉澱劑，可除去其他波峰干擾，所萃取量為 $311 (\pm 2)$ mg/L。蛋白質沉澱法所能萃取量，較高於液液萃取法，且其步驟較簡單，能有效縮短萃取時間，因此以蛋白質沉澱法為佳。添加低、中、高濃度之標準品時，果糖酸之回收率分別為 $98.28 (\pm 0.01)$ 、 $95.61 (\pm 0.01)$ 及 $89.04 (\pm 0.04)\%$ 。果糖酸之空白雜訊值的標準差為 0.0125，帶入公式計算可得果糖酸之偵測極限 (limit of detection, LOD) 為 2.016 mg/L，定量極限 (limit of quantitation, LOQ) 為 6.720 mg/L。最後調查市售樣品，僅在 E 牌水解醬油中測得果糖酸，顯示其胺基酸水解時有果糖酸產生，而其餘品牌之釀造醬油樣品則未檢出具有果糖酸，顯示其並未添加水解醬油。

一、前言

醬油 (soy sauce) 為亞洲飲食文化中最重要之調味料 (Yokotsuka, 1986)。傳統製程上，主要原料為黃豆及小麥為原料，混合米麴菌 (*Aspergillus oryzae*) 或醬油麴菌 (*Aspergillus sojae*) 製麴後，與食鹽水入缸，經長時間約 4 到 6 月的發酵及熟成，長時間發酵過程中會逐漸水解植物性蛋白，及釋放出游離胺基酸作為鮮味的主要成分，產生出含氨基酸、有機鹽、有機酸、各種醣類、醇類和酯類等特殊風味的製品 (Kaneko *et al.*, 2006)。然而在近代的工業生產上，耗時的生產過程成為醬油大量生產的一個問題 (Sasaki & Nunomura, 2003; Yang *et al.*, 2011)。因此，開發出將大豆及小麥中的植物性蛋白以鹽酸加熱數十小時，水解形成胺基酸，以降低生產時間及成本 (Yong & Wood, 1974)。醬油可依製造過程做分類，如：以食用蛋白經酸水解成的酸水解植物性蛋白 (acid hydrolyzed vegetable protein, acid-HVP) 醬油、釀造數個月製成的純釀造醬油 (naturally brewed soy sauce, NBS) 及以上兩種醬油按比例混合而成的調和醬油 (blended soy sauce) (CNS, 2002)。

而果糖酸 (levulinic acid) 及 3-單氯丙二醇 (3-monochloro-1,2-propanediol, 3-MCPD) 皆是製造水解醬油所產生的副產物 (Hamlet, 1998; Crews *et al.*, 2002)，由於 3-單氯丙二醇之檢測方法耗時且複雜，且有部分廠商對此特別處理，以脫脂大豆製備，使製造過程中生成的 3-單氯丙二醇降低至檢出線以下，因此以 3-單氯丙二醇做為指標可能有失準確性。而釀造醬油之果糖酸含量低於 0.1%，於化學醬油之含量高於 2%，其性質非常穩定且去除果糖酸成本過高，可作為判斷醬油摻偽之指標 (Lee & Khor, 2015; Jiang *et al.*, 2007)。

目前檢測果糖酸之含量普遍使用氣相層析儀 (gas chromatograph, GC) 搭配火焰離子偵測器 (flame ionization detector, FID) (CNS, 2002; Wang *et al.*, 1999; Yang & Choongt, 2007) 或搭配質譜儀 (mass spectrometer) 經固相萃取後進行檢測 (Jurado-Sánchez *et al.*, 2011)，及高效能液相層析儀 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 搭配紫外光偵測器 (UV detector) 或質譜儀檢測器 (Jiang *et al.*, 2006; Sano *et al.*, 2007; Yeh-Chen & Hsu, 1985)。

在臺灣尚未有相關法條強制規範產品需標明為釀造醬油或是調和醬油，2016 年 7 月，行政院之衛生福利部為透明化醬油之消費資訊，預告了「包裝醬油之品名及標示規定」草案，該規定預定自 2017 年 7 月起施行 (行政院衛生福利部，2016)。目前醬油市場充斥釀造醬油之標示，無從可知醬油產品實際內容，本研究發展以高效能液相層析 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 搭配紫外光偵測器 (UV detector) 測定醬油中果糖酸 (levulinic acid) 之含量，建立一個快速、簡易操作及高靈敏度之方法，以此判別是否有化學醬油摻入其中或其比例不符合標示之情形。

二、移動相之組成

使用 HPLC-PDA 於波長 192-360 nm 進行掃描，果糖酸之 UV 吸收光譜圖如圖一所示，測得波長於 210 nm 及 268 nm 皆有吸收波峰。因此，以果糖酸標準溶液比較其在波長 210 nm 及 268 nm 下之層析圖譜（如圖二、三），於 210 nm 下偵測，雖然靈敏度較高，但會偵測到未知波峰，且容易受其他物質干擾，影響數據之判讀。因此，選用於波長 268 nm 下進行果糖酸之偵測，此與 Jiang *et al.* (2007) 所採用之偵測波長相同。

油中含有許多有機酸，波峰容易重疊 (Kaneko *et al.*, 2006)，因此，為了使果糖酸之波峰能與其他雜峰完全分離，參考相關文獻之不同移動相條件進行分析。並根據波峰形狀、解析度及沖提時間，進而探討最適之移動相條件。

當移動相以 0.1% 磷酸水溶液 (Jiang *et al.*, 2007) 進行沖提時，果糖酸之波峰在滯留時間 28.6 分鐘出現（圖四），由圖可看出，沖提時間太長且有拖尾之現象，因此將磷酸水溶液濃度提高至 0.3%。使用 0.3% 磷酸水溶液 (A) 與含 0.3% 磷酸之甲醇 (B) 作為移動相，分別調整其比例為 80:20、90:10 及 95:5 (v/v) 結果如圖五至七所示。以 (A):(B) = 80:20 (v/v) 為移動相做 isocratic elution 時，果糖酸之滯留時間約在 8.82 分鐘，靈敏度高但沖提時間太短（圖五），恐怕以此條件分析醬油樣品時，果糖酸與樣品中其它波峰易有重疊之現象。當改以 (A):(B) = 90:10 (v/v) 沖提時，滯留時間約為 12.94 分鐘，沖提時間依舊太短（圖六）。若以 (A):(B) = 95:5 (v/v) 為移動相時，果糖酸之滯留時間約為 21.17 分鐘，雖然靈敏度較其他移動相組合為低，但以此條件分析樣品時，可能可以避免與其他波峰重疊（圖七）。

由上述結果可知，移動相比比例不同，造成沖提時間及靈敏度有明顯差異，且果糖酸又特別對移動相中添加甲醇之比例極為敏感，而最適移動相為以 (A) 0.3% 磷酸水溶液:(B) 含 0.3% 磷酸之甲醇 = 95:5 (v/v) 做 isocratic elution，以此作為後續實驗之移動相組成。果糖酸檢量線如圖八所示，方程式為 $y = 982.9x + 6126.3$ ，其 R^2 值為 0.9997，表示此方法具有良好之線性關係。

三、以不同方式萃取水解醬油中果糖酸之含量

將 E 牌水解醬油進行粗略萃取後，以 HPLC 分析之層析圖譜如圖九所示，於 20.70 分鐘出現一波峰，此與果糖酸標準品之滯留時間（圖七）接近，因此，使用 HPLC-PDA 於波長 190-360 nm 進行掃描，圖九中波峰 1 之 UV 吸收光譜則如圖十所示，與果糖酸標準品之 UV 吸收光譜圖（圖一）對照，兩者產生波峰之波型類似，且皆在波長 210 nm 及 268 nm 處皆有吸收，故判定由胺基酸液組成之水解醬油含有果糖酸之成分，並進行後續萃取方式之探討。

實驗流程如附圖二所示。參考賀等 (2004) 以無水乙醚 (absolute ether) 作為萃取溶劑，圖十一為以無水乙醚萃取醬油中果糖酸之層析圖，圖中無果糖酸之波峰，因此判定此法萃取效果不佳。將萃取溶液改為乙酸乙酯，其萃取液之層析圖如圖十二所示，於 20.90 分鐘出現一波峰，此與果糖酸標準品之滯留時間（圖七）接近。圖十二中波峰 1 之 UV 吸收光譜如圖十三所示，與圖一果糖酸標準品之 UV 吸收光譜圖類似，判定其為果糖酸之波峰，以此法萃取所得果糖酸萃取量為 $249 (\pm 5)$ mg/L。不同萃取次數對果糖酸萃取量之影響，如圖十四所示，在萃取次數為三次相較於一次及兩次有顯著較大萃取量，而與萃取四次無顯著差異，故選用萃取次數三次為最佳萃取次數。賀等 (2004) 以無水乙醚萃取四次。綜合以上結果可得知，醬油以三次之萃取次數，使用乙酸乙酯作為萃取溶劑，可萃取出較高萃取量為 $249 (\pm 5)$ mg/L。

參考 Jiang *et al.* (2006) 以乙酸鋅溶液及亞鐵氰化鉀作為沉澱劑，其上清液之層析結果如圖十五所示。圖中之波峰 1 之滯留時間與果糖酸標準品接近，而且其 UV 吸收光譜圖（圖十六）與果糖酸標準品之 UV 吸收光譜圖（圖一）相似，因此判定其為果糖酸，萃取量為 $311.39 (\pm 2.26)$ mg/L，Jiang *et al.* (2006) 表示僅以樣品直接稀釋後進樣，於果糖酸滯留時間處有其它波峰干擾，經蛋白質沉澱後，可除去干擾物。圖十七為以甲醇作為沉澱劑進行果糖酸分析，可發現在果糖酸標準品之滯留時間處有兩波峰重疊，比對波峰 1 之 UV 吸收光譜圖（圖十八）與果糖酸標準品之 UV 吸收光譜圖（圖一），可發現兩者類似，然而波峰 1 旁有雜峰干擾，顯示以甲醇作為沉澱劑無法有效去除干擾。綜合以上結果可知，水解醬油以乙酸鋅溶液及亞鐵氰化鉀作為沉澱劑，可有效去除干擾，回收率也較液液萃取法來得多，並且步驟相對簡易快速。

在 E 牌水解醬油中，蛋白質沉澱法所能萃取量 $311 (\pm 2)$ mg/L，較高於液液萃取法之萃取量 $249 (\pm 5)$ mg/L，且相對於液液萃取法，其步驟較簡單，能有效縮短萃取時間，因此蛋白質沉澱法較液液萃取法為佳。

四、回收率、偵測極限、定量極限及樣品之分析

取 5 mL 含果糖酸之 E 牌水解醬油分別添加 2.5、12.5、25.0 mg/mL 之果糖酸標準品溶液 1 mL，以乙酸鋅溶液及亞鐵氰化鉀作為沉澱劑，再以上述實驗所建立之 HPLC 最適條件進行定量分析，所得回收率之結果如表一所示。添加低、中、高濃度之標準品時，果糖酸之回收率分別為 98.28 (± 0.01)、95.61 (± 0.01) 及 89.04 (± 0.04)%，顯示使用本實驗所建立之蛋白質沉澱法進行萃取，並搭配 HPLC 最適分析條件，可有效進行醬油產品中果糖酸之分析。

精確秤取果糖酸之標準品 50 mg，以移動相定容至 5 mL，製備成 10000 ppm 之溶液，再分別稀釋成 5000、2500、1000、500 及 100 ppm，以 0.22 μ m 之濾膜過濾，於波長 268 nm 進行分析，以波峰高度為縱軸，以標準溶液之濃度為橫軸，製作成標準溶液之檢量線，並將空白樣品進行分析，得空白雜訊以求偵測極限 (limit of quantitation, LOQ) 及定量極限 (limit of detection, LOD) (Armbruster *et al.*, 1994)。果糖酸偵測極限之檢量線如圖十九所示。其方程式如表二所示，果糖酸之空白雜訊值的標準差為 0.0125，帶入公式計算可得果糖酸之偵測極限為 2.016 mg/L，定量極限為 6.720 mg/L。賀等 (2004) 以液液萃取法進行果糖酸萃取，最後以 HPLC 搭配紫外光偵測器 (UV detector) 進行分析，所得果糖酸之定量極限為 0.01 mg/mL，約為本實驗所測得偵測極限之 5 倍。

A、B 及 C 牌市售純釀醬油，購自基隆之超市；D 牌連鎖店用醬油，取自基隆之連鎖店；E 牌水解醬油，取自基隆之餐廳。市售及餐廳用醬油之樣品經前述最適萃取及層析條件分析其中果糖酸含量，其結果如表三所示。其中僅 E 牌水解醬油含有果糖酸，其濃度為 311 (± 2) mg/L。其餘之醬油產品則未檢出果糖酸，結果顯示其胺基酸水解時有果糖酸產生，而其餘品牌之醬油樣品則未檢出具有果糖酸，顯示其並未添加水解醬油。

五、 結論

1. 使用 HPLC-UV 及 InertSustain[®] C₁₈ 管柱進行果糖酸層析之最適分析條件為：使用 0.3% 磷酸水溶液：含 0.3% 磷酸之甲醇 = 95:5 (v/v) 進行等位沖提，偵測波長為 268 nm。
2. 在 E 牌水解醬油中，蛋白質沉澱法所能萃取量 311 ($\pm$ 2) mg/L，較高於液液萃取法之萃取量 249 ($\pm$ 5) mg/L，且相對於液液萃取法，其步驟較簡單，能有效縮短萃取時間，因此蛋白質沉澱法較液液萃取法為佳。
3. 無論以蛋白質沉澱法或液液萃取法，皆可在 E 牌水解醬油中測得果糖酸，顯示其胺基酸水解時有果糖酸產生，而其餘品牌之醬油樣品則未檢出具有果糖酸，顯示其並未添加水解醬油。

參考文獻

- 行政院衛生福利部 (2016)。「包裝醬油之品名及標示規定」草案公告法。署授食字第 1051301017 號。
- 賀才珍、傅一敏、胡艾莉，2004，高效液相色譜法測定醬油乙醯丙酸含量。上海師範大學學報：自然科學版。33(3)：106-108。
- Chinese national standard (CNS), (2002). Soy sauce. 423, N5006.
- Crews, C., Hough, P., Brereton, P., & Harvey, D. (2002). Survey of 3-monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) in selected food 67 groups, 1999-2000, 2002. *Food Additives and Contaminants*, 19(1), 22-27.
- Hamlet C. G. (1998). Analytical methods for determination of 3-chloro-1,2-propandiol and 2-chloro-1,3-propandiol in 68 hydrolysed vegetable proteins, seasonings and food products using gas Chromatography ion trap tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants* 15, 451-465.
- Jiang, Y., Ni, Y., & Zhu, H. (2006). Determination of levulinic acid in soy sauce by liquid chromatography. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 30, 40-42.
- Jiang, Y., Ni, Y. N., & Zhu, H. F. (2007). Determination of proportion of fermented soy sauce added in blended soy sauce. *Food Science*, 28(6), 116-119.
- Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., & Gallego, M. (2011). Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. *Talanta*, 84(3), 924-930.
- Kaneko, S., Kumazawa, K., Masuda, H., Henze, A., & Hofmann, T. (2006). Molecular and sensory studies on the umami taste of Japanese green tea. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 54(7), 2688-2694.
- Lee, B. Q., & Khor, S. M. (2015). 3-Chloropropane-1, 2-diol (3-MCPD) in soy sauce: A review on the formation, reduction, and detection of this potential carcinogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(1), 48-66.
- Sano, A., Satoh, T., Oguma, T., Nakatoh, A., Satoh, J., & Ohgawara, T. (2007). Determination of levulinic acid in soy sauce by liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Food Chemistry*, 105, 1242-1247.
- Sasaki, M., & Nunomura, N. (2003). Fermented foods/soy(soya) sauce. *Encyclopedia of food sciences and nutrition* 2nd ed., 2359-2369.
- Verevkin, S. P., & Emel'yanenko, V. N. (2012). Renewable platform-chemicals and materials: Thermochemical study of levulinic acid. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 46, 94-98.
- Wang, M. L., Lin, H. J., Lee, M. H., & Choong, Y. M. (1999). A rapid method for direct determination of levulinic acid in soy sauce. *Journal of Food and Drug Analysis*, 7(2), 143-152.

- Yang, H. J., Park, S., Pak, V., Chung, K. R., & Kwon, D. Y. (2011). *Fermented soybean products and their bioactive compounds*. Songnam, Republic of Korea : INTECH Open Access Publisher.PP.21-58.
- Yang, M. H., & Choong, Y. M. (2001). A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂-C₁₂) volatile organic acids in foods. *Food Chemistry*, 75(1), 101-108.
- Yeh-Chen, S. L., & Hsu, C. T. (1985). Liquid chromatographic determination of protein acid hydrolysate content in blended soy sauce. *Journal-Association of Official Analytical Chemists*, 68(4), 618-621.
- Yokotsuka, T. (1986). Soy sauce biochemistry. *Advanced in Food Research*, 30, 195-329.
- Yong, F. M., & Wood, B. J. B. (1974). Microbiology and biochemistry of soy sauce fermentation. *Advances in Applied Microbiology*, 17, 157-194.

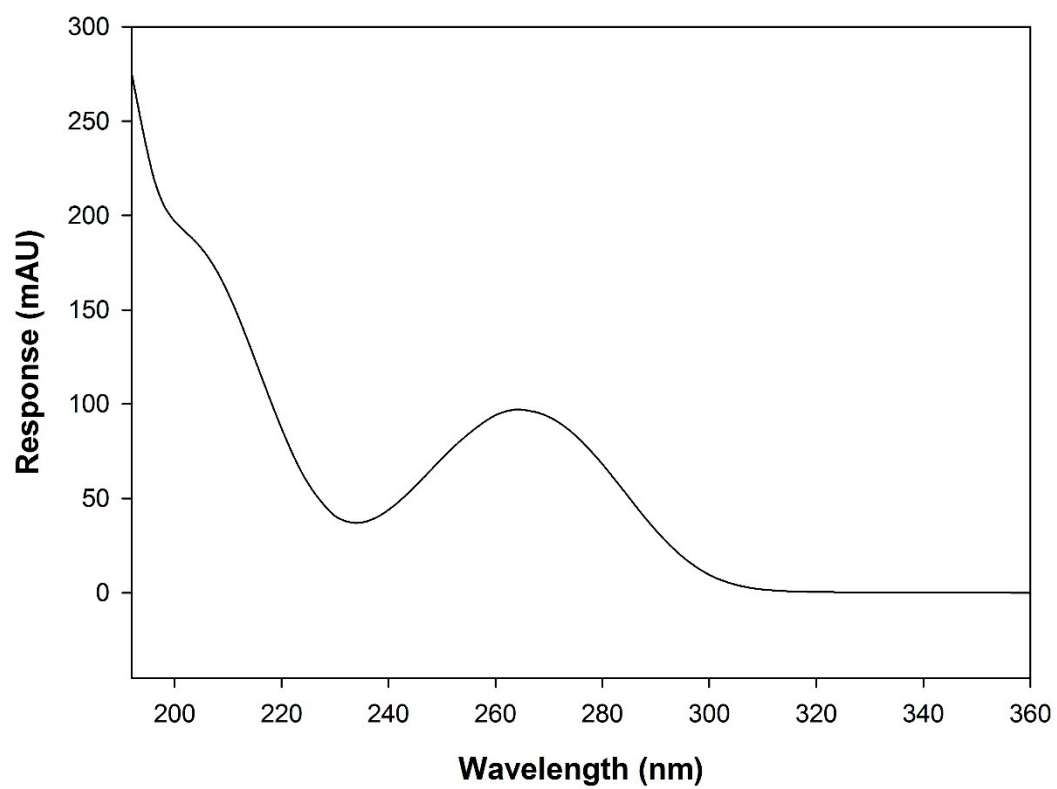


Figure 1. UV spectrum of levulinic acid standard.

圖一、果糖酸標準品之 UV 吸收光譜圖。

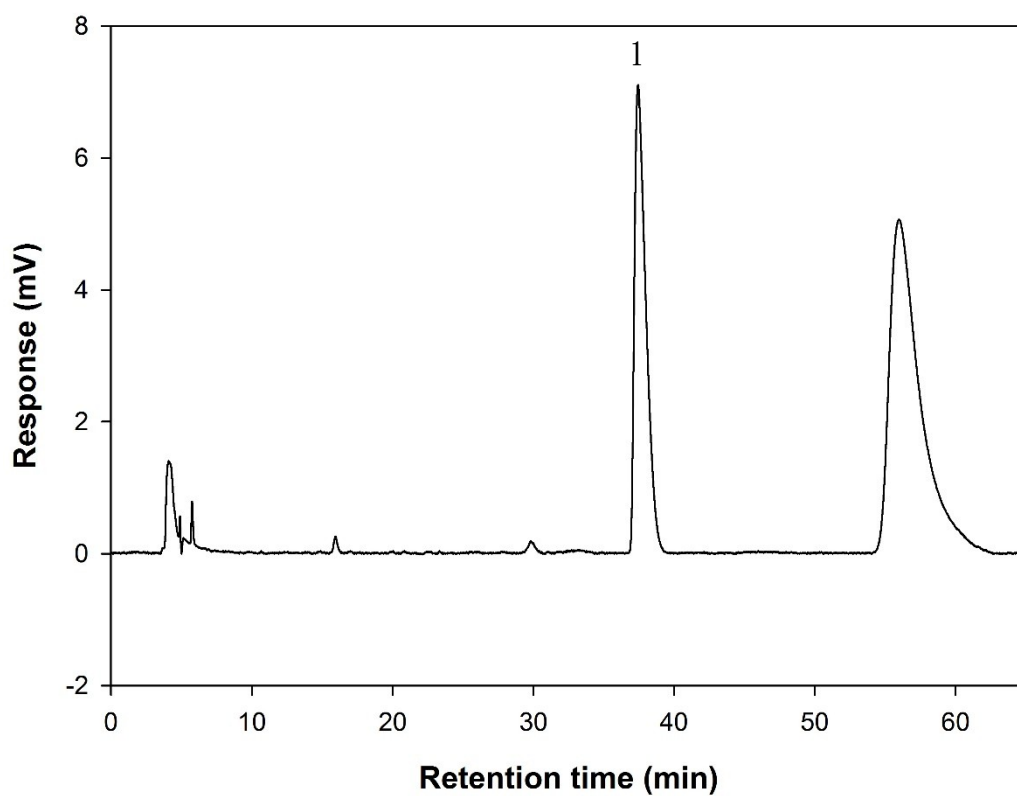


Figure 2. HPLC chromatogram of levulinic acid standard detecting at 210 nm.

Mobile phase: 0.1% phosphoric acid aqueous solution

Column: InertSustain[®] C₁₈

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖二、果糖酸標準品於波長 210 nm 偵測之高效能液相層析圖。

移動相：0.1% 磷酸水溶液

管柱：InertSustain[®] C₁₈

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

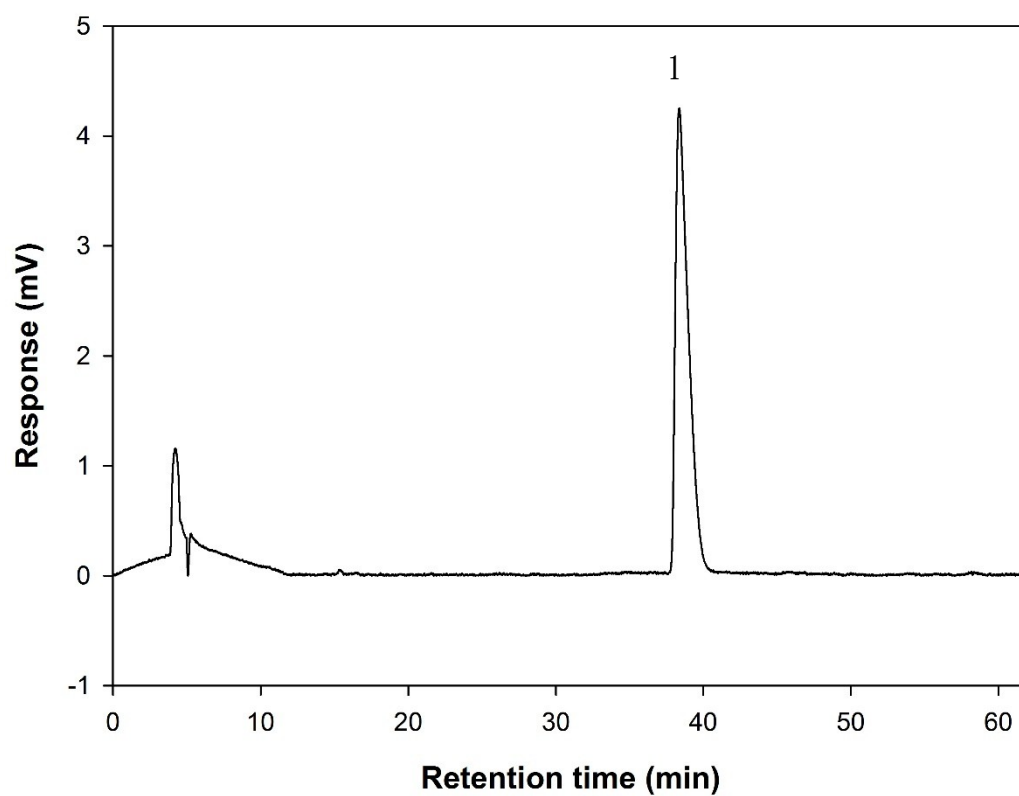


Figure 3. HPLC chromatogram of levulinic acid standard detecting at 268 nm.

Mobile phase: 0.1% phosphoric acid aqueous solution

Column: InertSustain[®] C₁₈

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖三、果糖酸標準品於波長 268 nm 偵測之高效能液相層析圖。

移動相：0.1% 磷酸水溶液

管柱：InertSustain[®] C₁₈

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

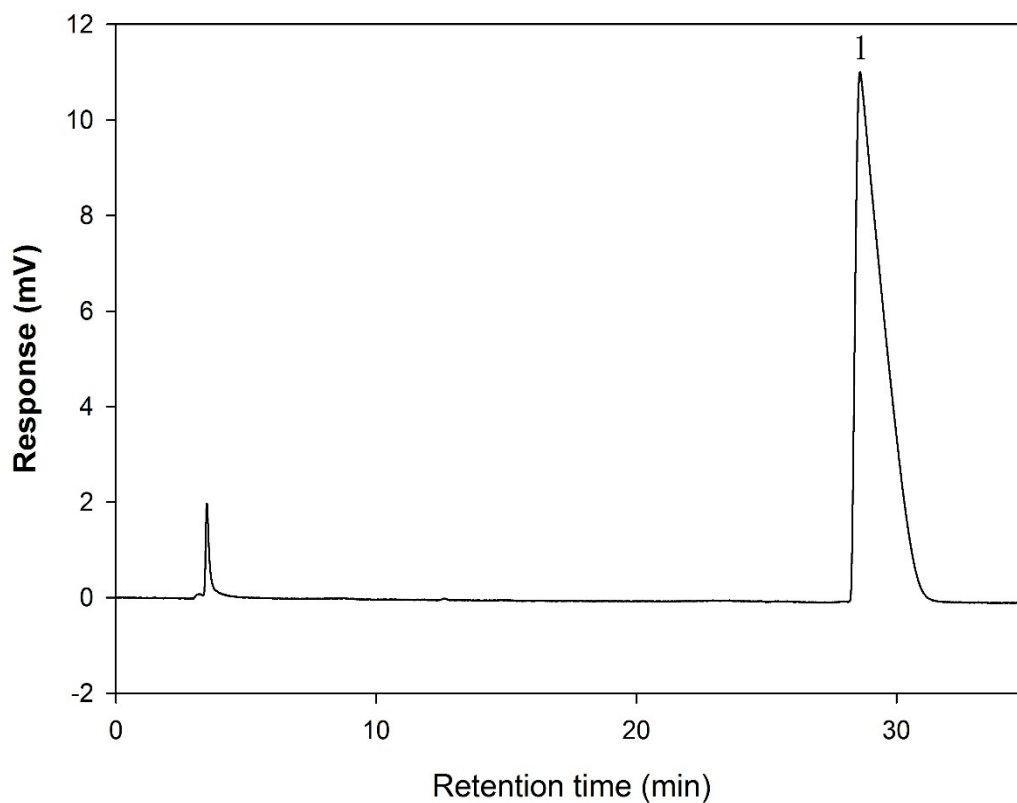


Figure 4. HPLC chromatogram of levulinic acid standard by using the mobile phase of 0.1% phosphoric acid aqueous solution for isocratic elution.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖四、使用 0.1% 磷酸水溶液為移動相做等位沖提時果糖酸標準品之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

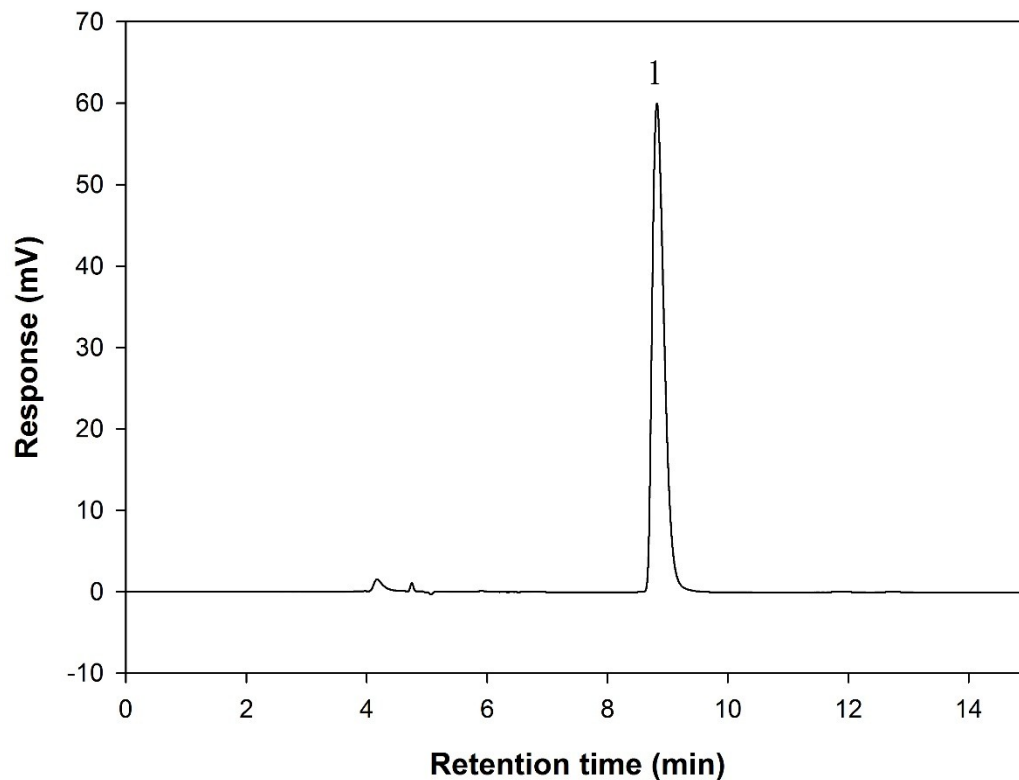


Figure 5. HPLC chromatogram of levulinic acid standard by using the mobile phase of 0.3% phosphoric acid in water : 0.3% phosphoric acid in methanol = 80 : 20 (v/v) for isocratic elution.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖五、使用 0.3% 磷酸水溶液：0.3% 磷酸之甲醇= 80：20 (v/v) 為移動相做等位沖提時果糖酸標準品之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

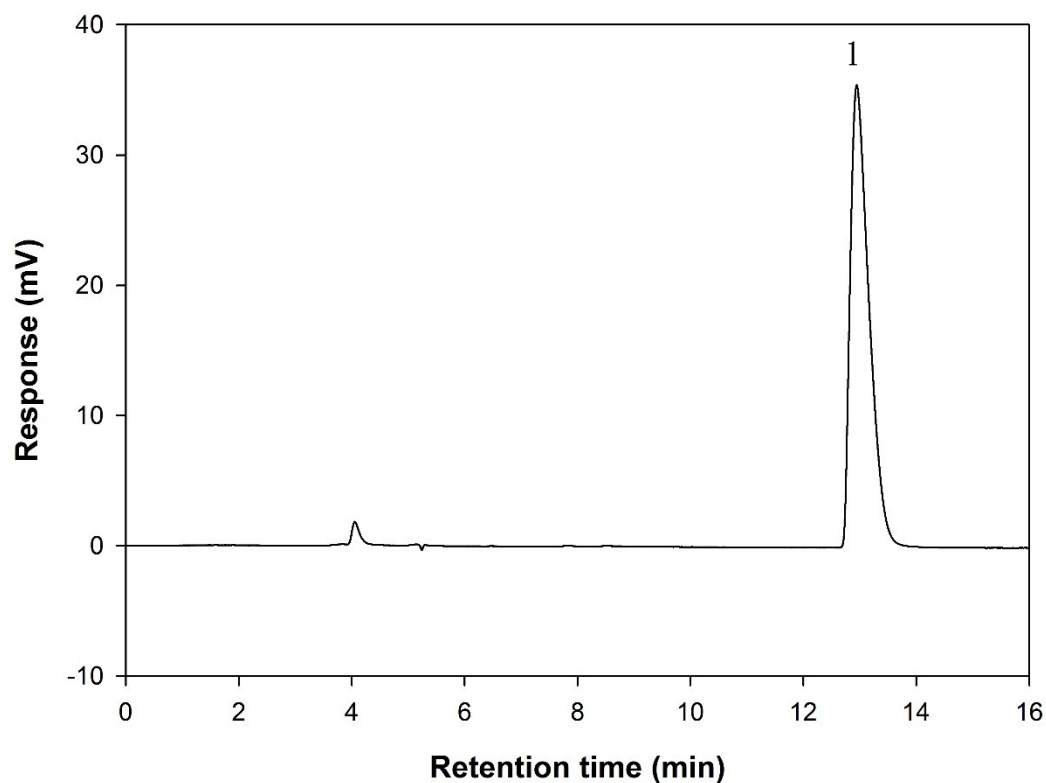


Figure 6. HPLC chromatogram of levulinic acid standard by using the mobile phase of 0.3% phosphoric acid in water : 0.3% phosphoric acid in methanol = 90 : 10 (v/v) for isocratic elution.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖六、使用 0.3% 磷酸水溶液：0.3% 磷酸之甲醇= 90：10 (v/v) 為移動相做等位沖提時果糖酸標準品之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

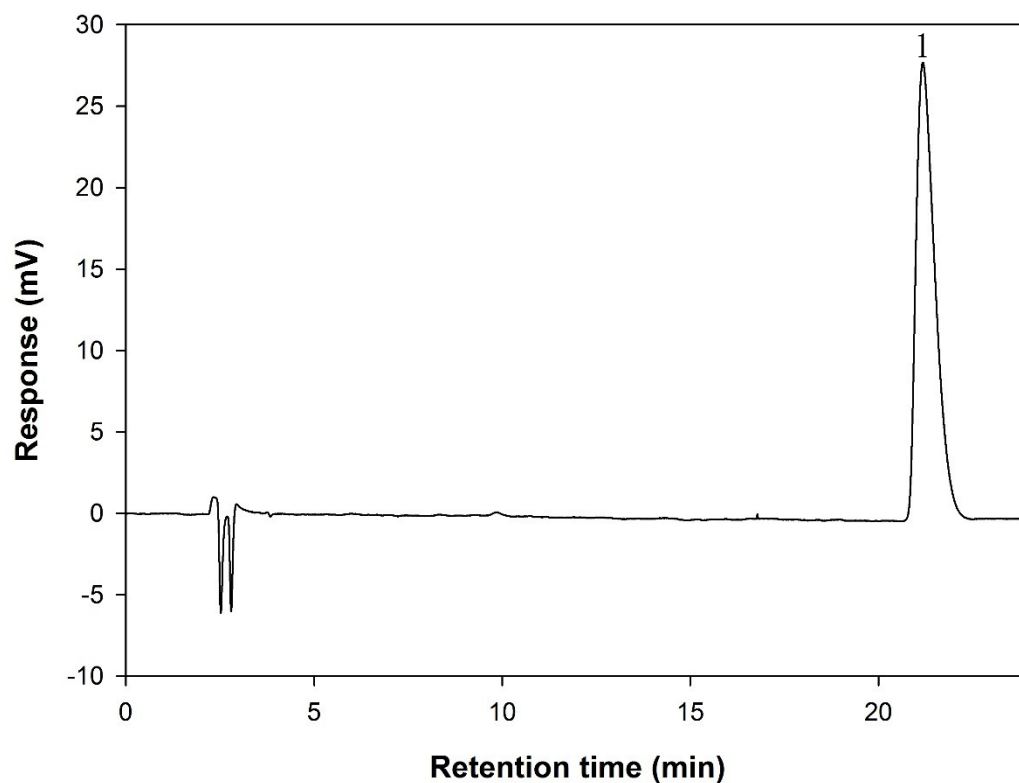


Figure 7. HPLC chromatogram of levulinic acid standard by using the mobile phase of 0.3% phosphoric acid in water : 0.3% phosphoric acid in methanol = 95 : 5 (v/v) for isocratic elution.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖七、使用 0.3% 磷酸水溶液：0.3% 磷酸之甲醇= 95：5 (v/v) 為移動相做等位沖提時果糖酸標準品之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

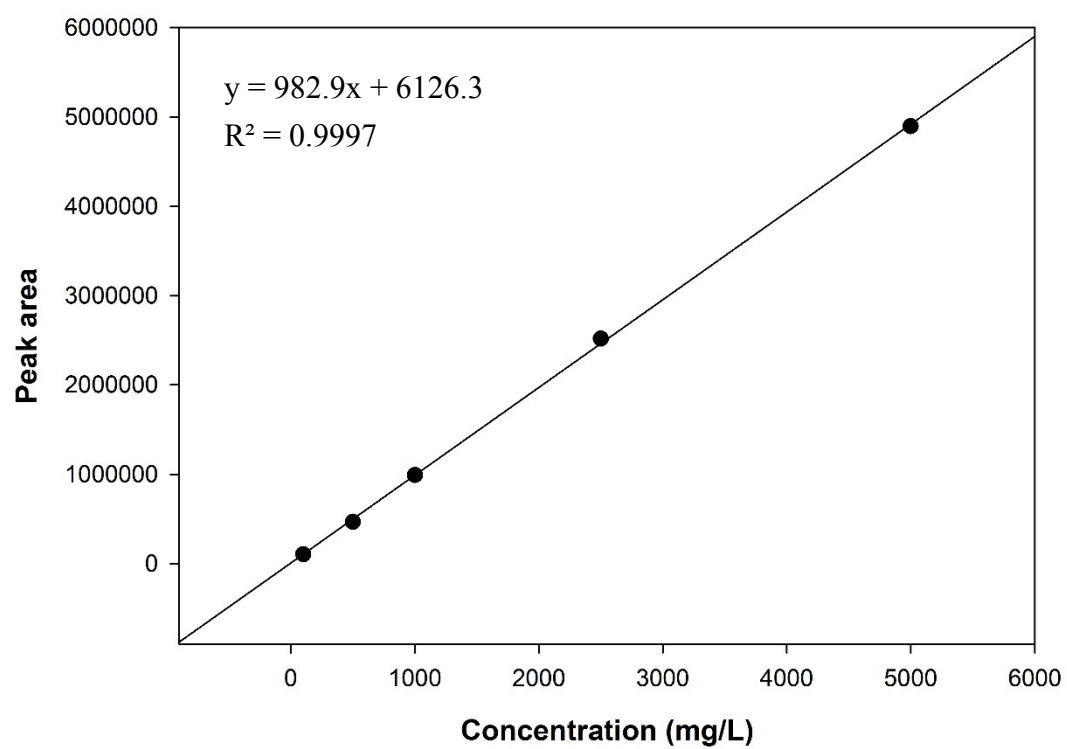


Figure 8. Calibration curve for levulinic acid standard.

圖八、果糖酸標準品之檢量線。

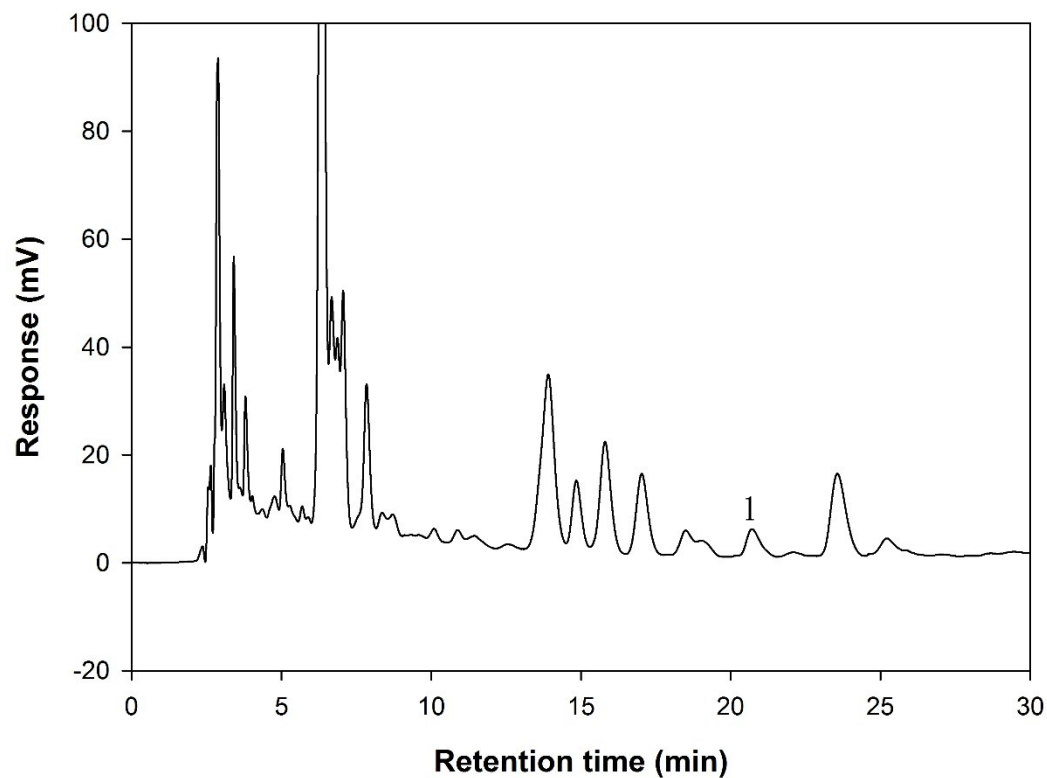


Figure 9. HPLC chromatogram of soy sauce (brand E).

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖九、水解醬油 E 牌之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

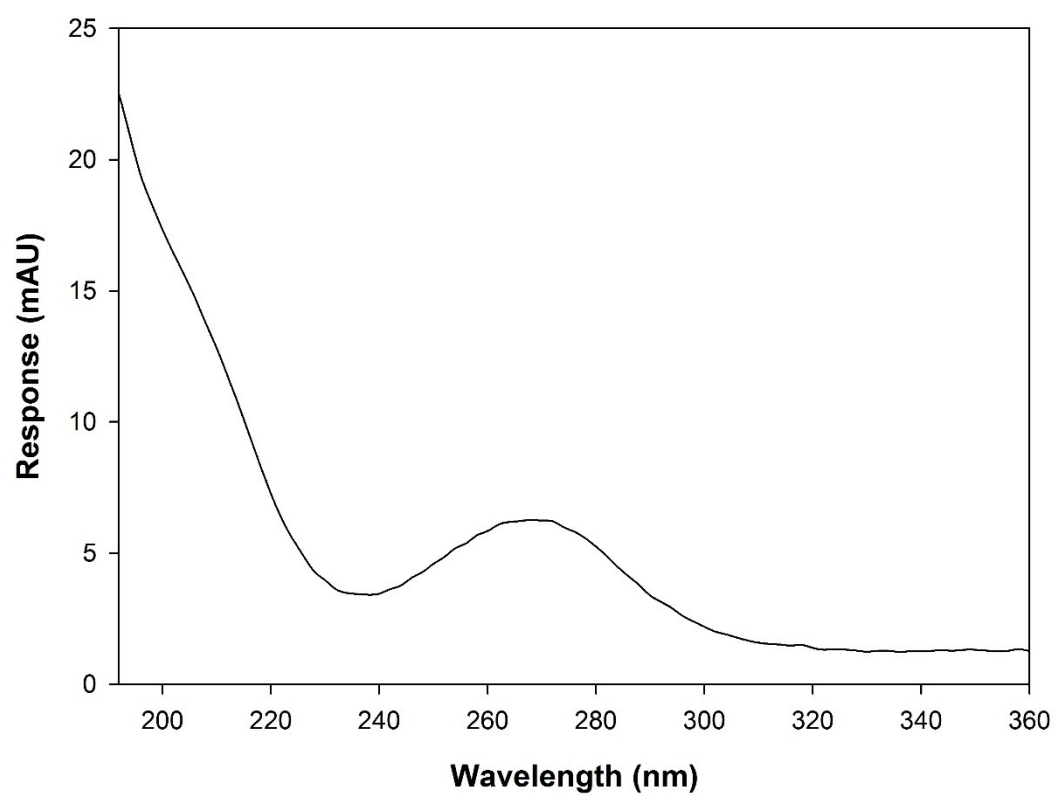


Figure 10. UV spectrum obtained by HPLC-PDA for peak1 of figure 9.

圖十、以 HPLC-PDA 測定圖九之波峰 1 所得之 UV 吸收光譜圖。

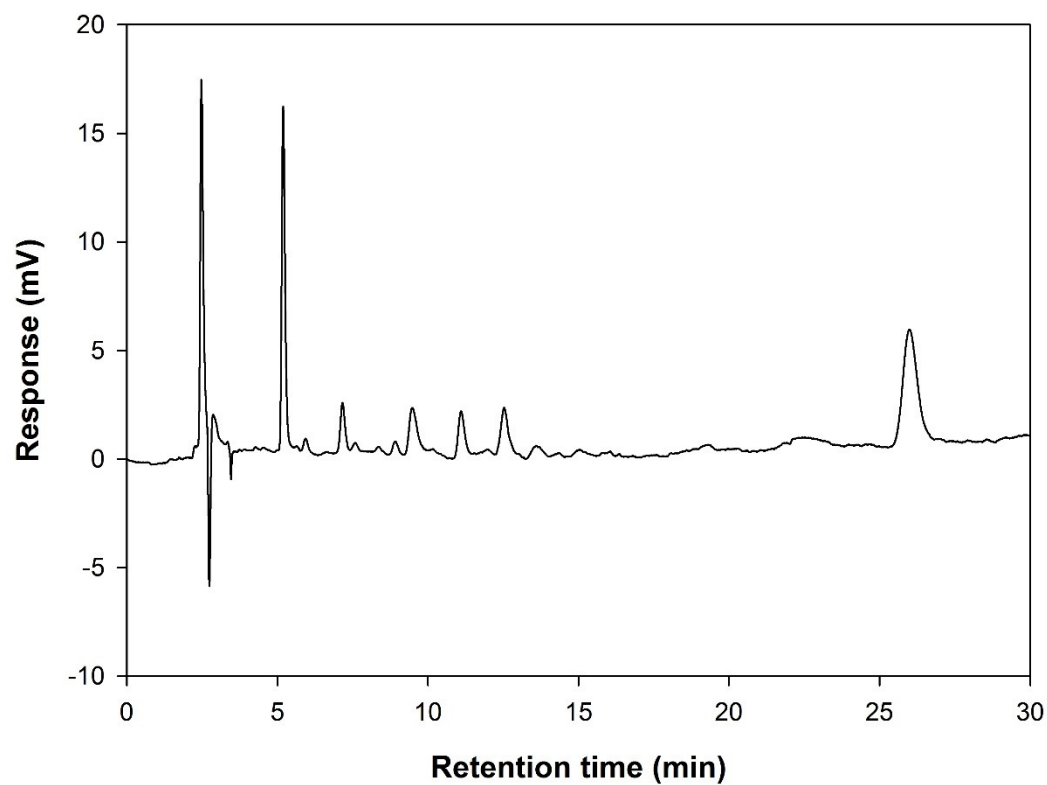


Figure 11. HPLC chromatogram of soy sauce (brand E) extracted by liquid-liquid extraction with anhydrous ether as the extractant.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

圖十一、以無水乙醚為萃取劑，液液萃取水解醬油 E 牌之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

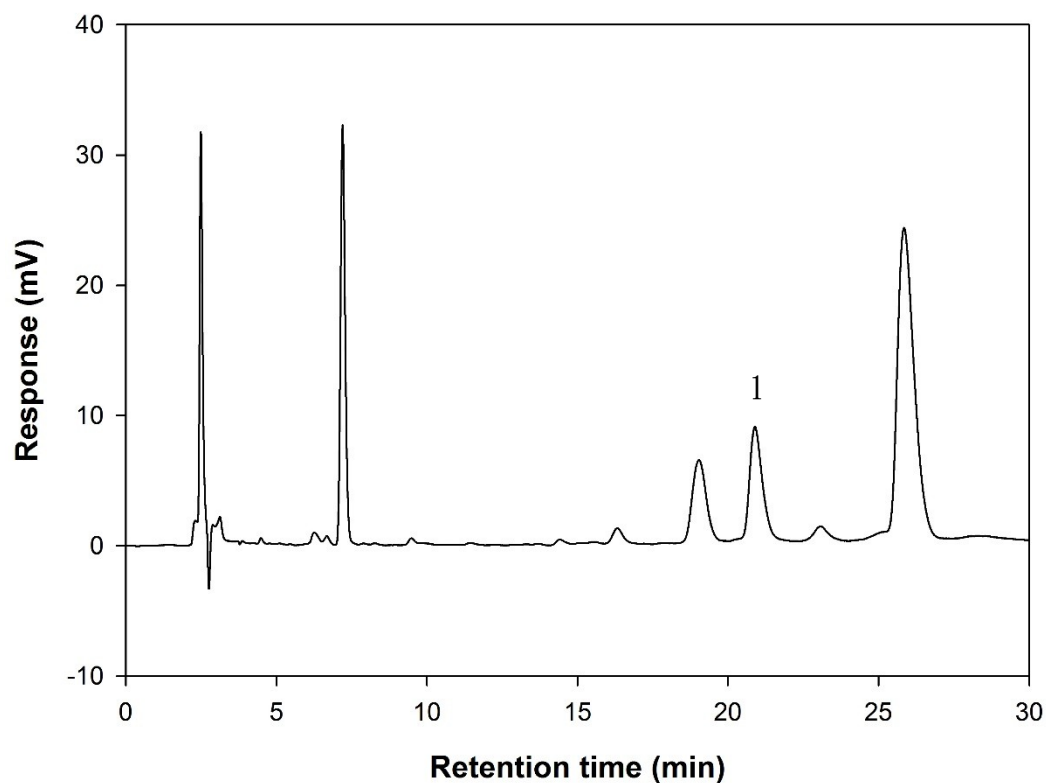


Figure 12. HPLC chromatogram of soy sauce (brand E) extracted by liquid-liquid extraction with ethyl acetate as the extractant.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖十二、以乙酸乙酯為萃取劑，液液萃取水解醬油 E 牌之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

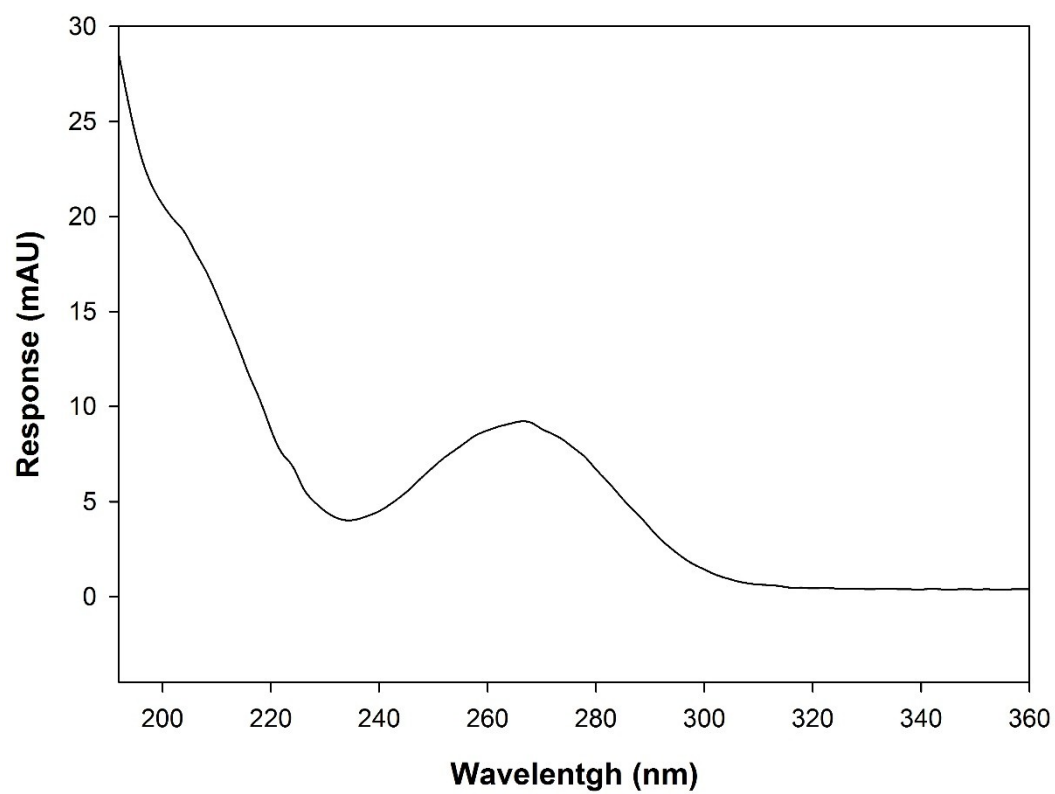


Figure 13. UV spectrum obtained by HPLC-PDA for peak 1 of figure 12.

圖十三、以 HPLC – PDA 測定圖十二之波峰 1 所得之 UV 吸收光譜圖。

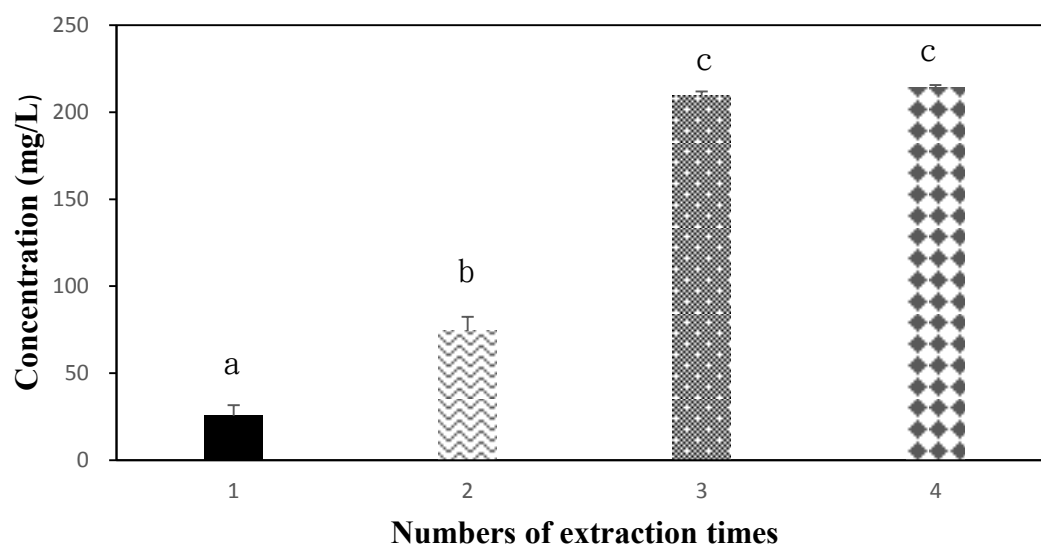


Figure 14. The effect of numbers of extraction times on the amounts of levulinic acid extracted by liquid – liquid extraction. Values are means of triplicate determinations and standard are shown as error bars. Different letters represents significant difference in levulinic acid ($p < 0.05$).

圖十四、以液液萃取果糖酸時，萃取次數對萃取量之影響。

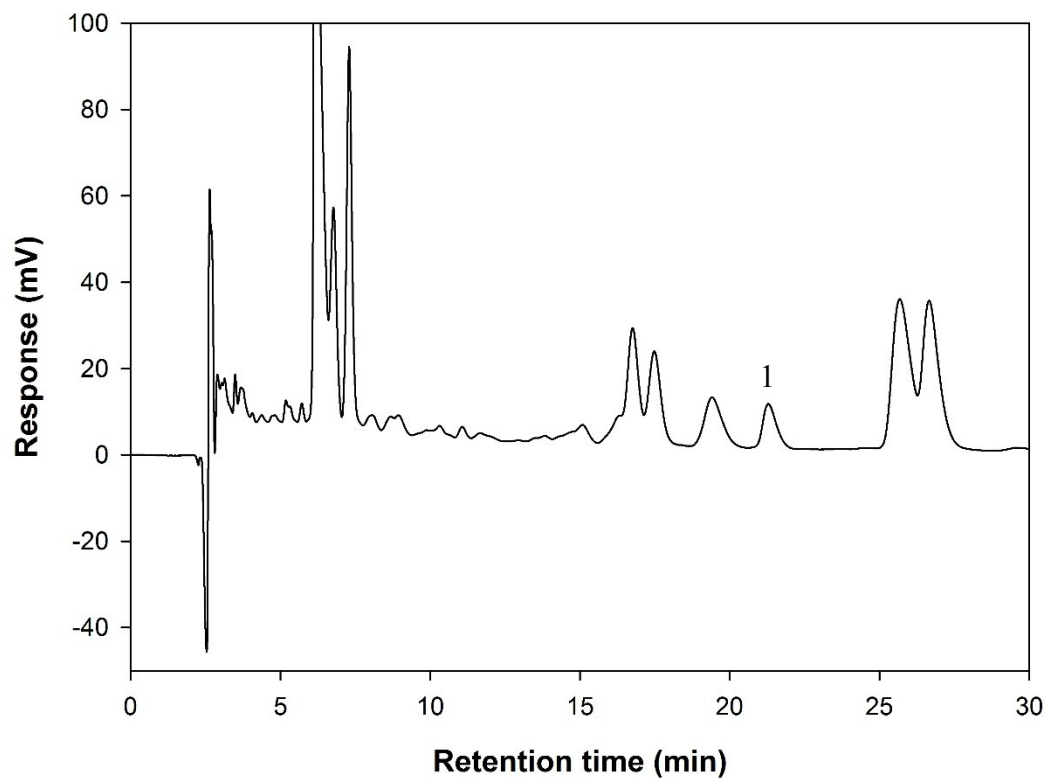


Figure 15. HPLC chromatogram of soy sauce (brand E) extracted by protein precipitation using zinc acetate and potassium hexacyanoferrate (II) as the precipitant.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖十五、以乙酸鋅及亞鐵氰化鉀為沉澱劑之蛋白質沉澱法所得 E 牌水解醬油萃取液之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

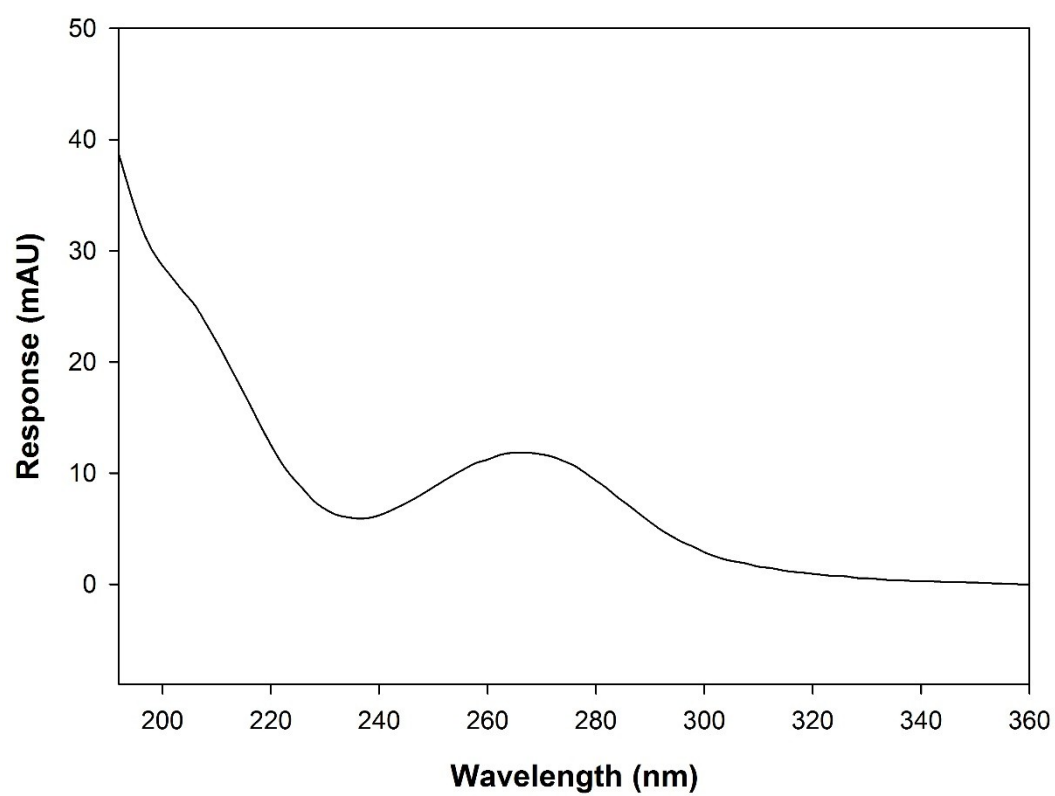


Figure 16. UV spectrum obtained by HPLC-PDA for peak 1 of figure 15.

圖十六、以 HPLC – PDA 測定圖十五之波峰 1 所得之 UV 吸收光譜圖。

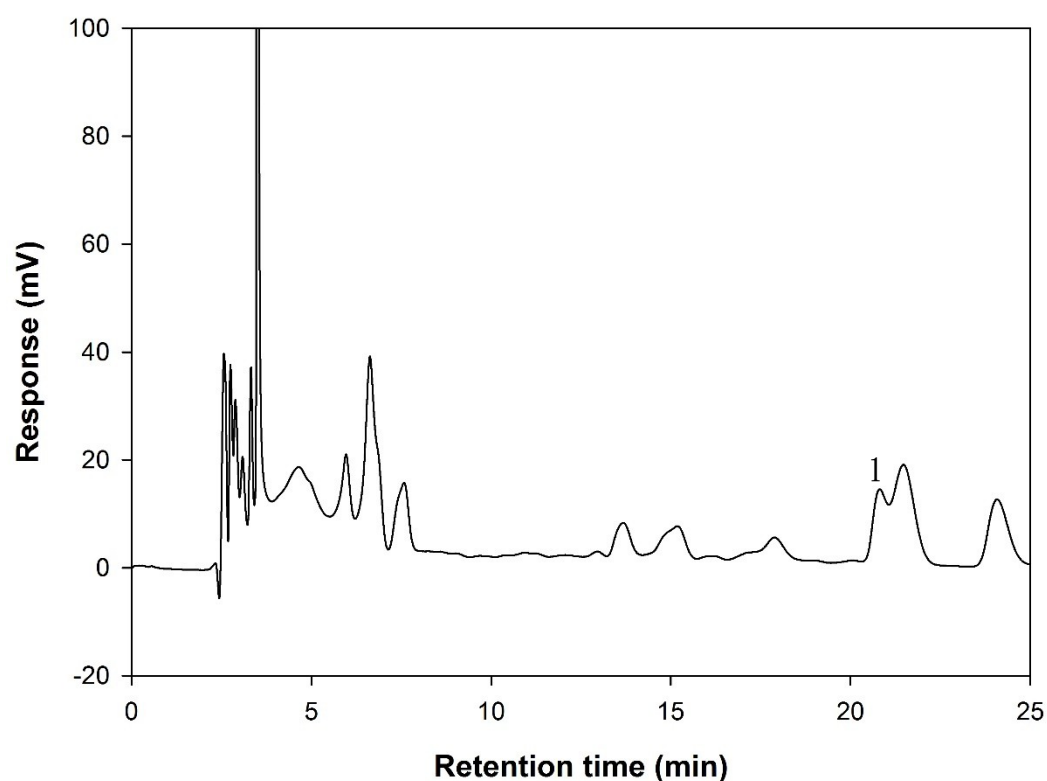


Figure 17. HPLC chromatogram of soy sauce (brand E) extracted by protein precipitation using methanol as the precipitant.

Column: InertSustain[®] C₁₈

Detector: UV detector at 268 nm

Flow rate: 1.0 mL/min

Peak identification: 1. levulinic acid

圖十七、以甲醇作為沉澱劑之蛋白質沉澱法所得 E 牌水解醬油萃取液之高效能液相層析圖譜。

管柱：InertSustain[®] C₁₈

偵測器：紫外光偵測器於波長 268 nm

流速：1.0 毫升/分鐘

波峰名稱：1. 果糖酸

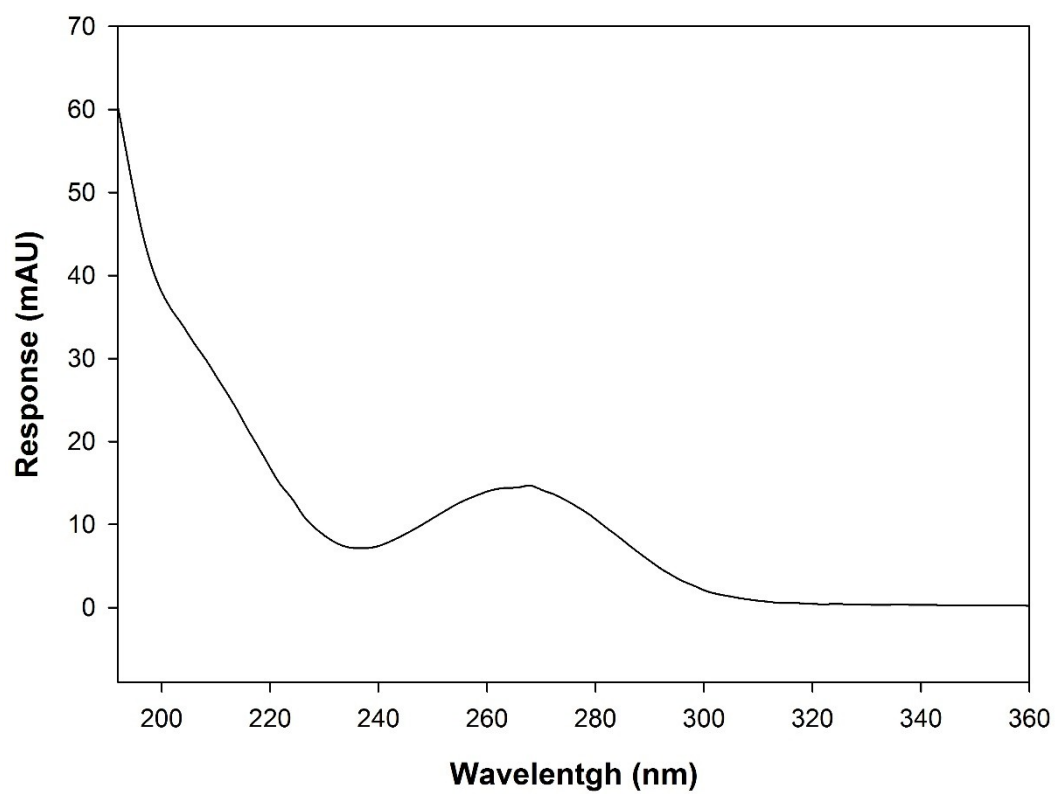


Figure 18. UV spectrum obtained by HPLC-PDA for peak 1 of figure 18.

圖十八、以 HPLC – PDA 測定圖十八之波峰 1 所得之 UV 吸收光譜圖。

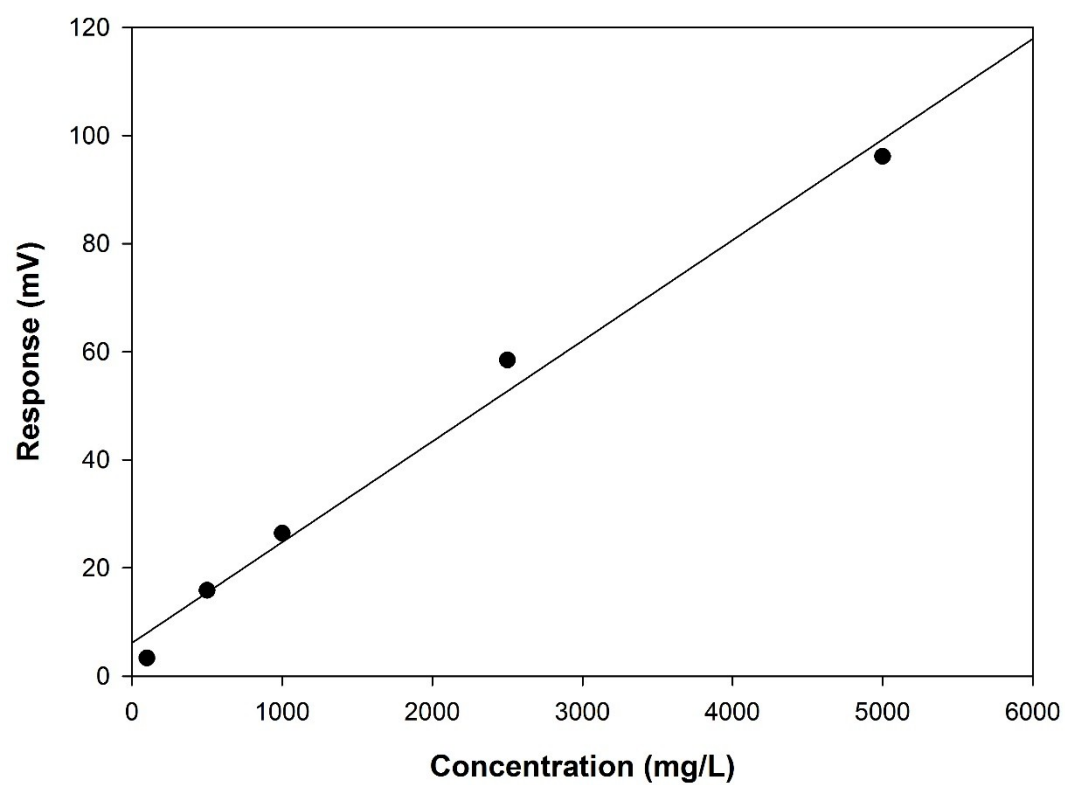


Figure 19. The detection limit calibration curve for levulinic acid.

圖十九、果糖酸之偵測極限檢量線。

Table 1. The recovery of levulinic acid from soy sause products

表一、醬油產品中果糖酸之回收率

	Added (mg/mL)	Found (mg/mL)	Recovery (%)
Levulinic acid	0	0	—
	2.5	2.46 ± 0.03	98.28 ± 0.01
	12.5	11.95 ± 0.01	95.61 ± 0.01
	25.0	22.26 ± 0.08	89.04 ± 0.04

Value of ± SD are standard deriation (n = 3).

Table 2. The limit of detection (LOD) and limit of quantitation (LOQ) of levulinic acid

表二、果糖酸之偵測極限與定量極限

	Regression equation	R ²	SD ^a	LOD (mg / L)	LOQ (mg / L)
Levulinic acid	y = 0.0186x + 6.1306	0.9879	0.0125	2.016	6.720

^aThe standard deviation of the blank response.

1. R² : coefficient of determination

2. LOD : limit of detection.

LOD = 3 × SD ÷ m (m : slope of the calibration curve)

3. LOQ : limit of quantitation.

LOQ = 10 × SD ÷ m (m : slope of the calibration curve)

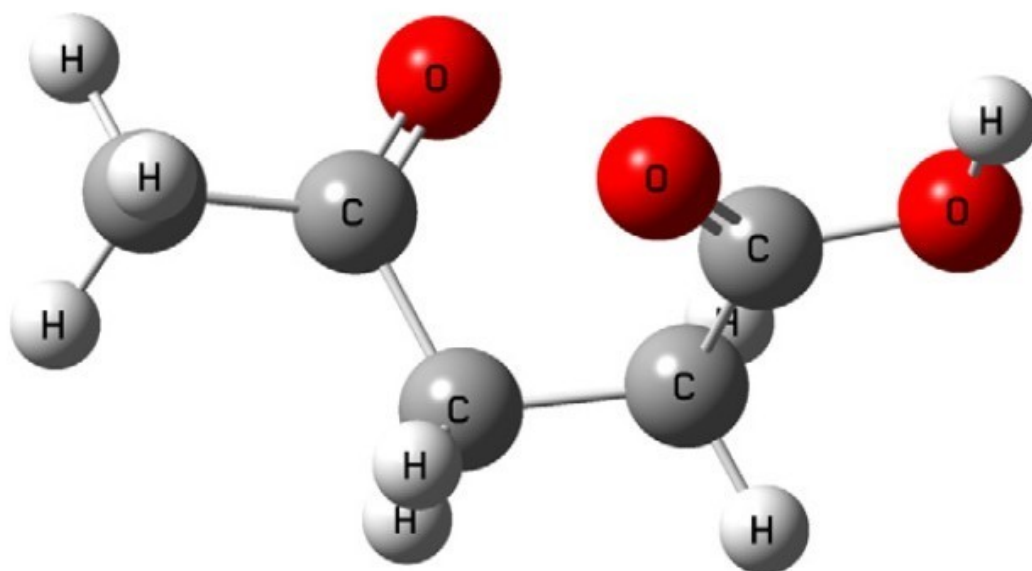
Table 3. Contents of levulinic acid in soy sauce products

表三、醬油產品中果糖酸之含量

Brand	Sampling location	Concentration (mg/L)
A	Supermarket at Keelung	ND ^a
B	Supermarket at Keelung	ND ^a
C	Supermarket at Keelung	ND ^a
D	Restaurant at Keelung	ND ^a
E	Restaurant at Keelung	311 ± 2

Value of ± SD are standard deviation (n = 3).

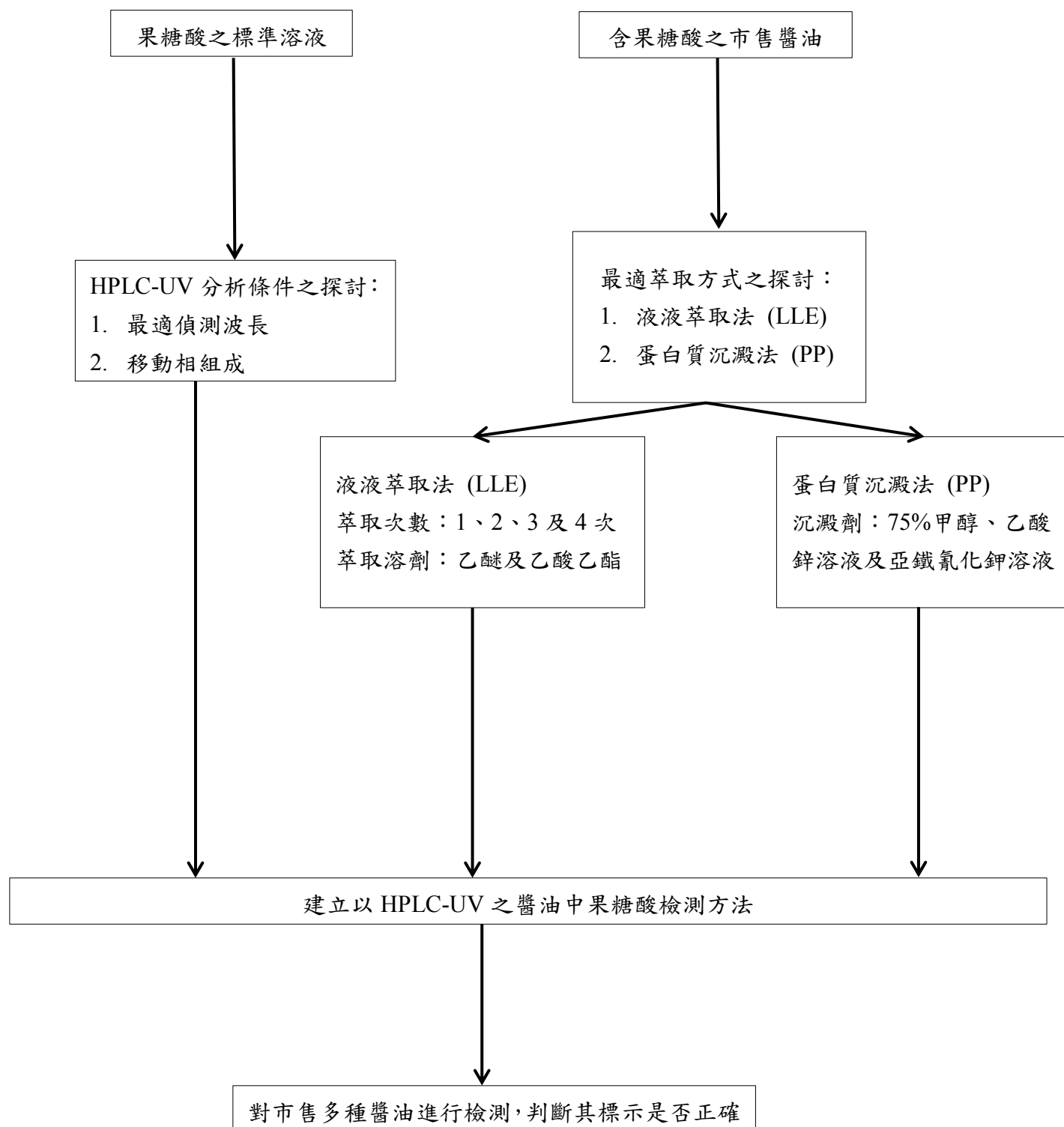
ND^a means not detected.



(Verevkin *et al.*, 2012)

Appendicular figure 1. The structure of levulinic acid.

附圖一、果糖酸之結構式。



Appendicular figure 2. The process of experiment.

附圖二、實驗流程。

