

魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法修正草案總說明

為加強食品添加物之管理，並依據食品安全衛生管理法第三十八條規定：「各級主管機關執行食品、食品添加物、食品器具、食品容器或包裝及食品用洗潔劑之檢驗，其檢驗方法，經食品檢驗方法諮議會諮議，由中央主管機關定之」，爰擬具「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」修正草案，其修正要點如下：

- 一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「內部標準溶液之配製」及「檢液之調製」，依檢驗方法格式進行文字修正，另增列「試劑之調製」。
- 二、「標準溶液之配製」修正對照用標準品之配製濃度，並增列內部標準品之配製。
- 三、「鑑別試驗及含量測定」修正「氣相層析測定條件」之層析梯度，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。
- 四、「附註」刪除最低檢出限量。
- 五、增列參考文獻及參考層析圖譜。
- 六、增修訂部分文字。

魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法修正草案對照表

修正規定	現行規定	說明
<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於魚油中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)及二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：檢體經鹼水解、轉酯化後，以氣相層析儀(gas chromatograph, GC)分析之方法。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 氣相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：火焰離子檢出器(flame ionization detector, FID)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm，內徑0.25 mm × 30 m，或同級品。</p> <p>2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.1.3. 加熱器(Block heater)：50～200°C。</p> <p>2.2. 試藥：正己烷、氫氧化鈉、甲醇、氯化鈉、無水硫酸鈉及含14%三氟化硼甲醇溶液(boron trifluoride in methanol)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 MΩ·cm以上)；<u>甲基二十碳五烯酸酯(methyl eicosapentaenoate)及甲基二十二碳六烯酸酯(methyl docosahexaenoate)對照用標準品；甲基二十三烷酸酯(methyl tricosanoate)內部標準品。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 容量瓶：10 mL及25 mL，褐色。</p> <p>2.3.2. 玻璃瓶：16 mL，褐色，附Teflon瓶蓋。</p> <p>2.4. 試劑之調製：</p> <p>2.4.1. 飽和氯化鈉溶液：<u>取氯化鈉40 g，加入去離子水100 mL，攪拌靜置後，取上層液備用。</u></p> <p>2.4.2. 1 N氫氧化鈉甲醇溶液：<u>取氫氧化鈉4 g，以甲醇溶解使成</u></p>	<p>1. 適用範圍：本檢驗方法適用於魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗。</p> <p>2. 檢驗方法：氣相層析法(gas chromatography, GC)。</p> <p>2.1. 裝置：</p> <p>2.1.1. 氣相層析儀：</p> <p>2.1.1.1. 檢出器：火焰離子檢出器(flame ionization detector, FID)。</p> <p>2.1.1.2. 層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm，內徑0.25 mm × 30 m，或同級品。</p> <p>2.2. 試藥：正己烷、氫氧化鈉、甲醇、氯化鈉、無水硫酸鈉、14%三氟化硼甲醇溶液均採用化學試藥特級。<u>二十碳五烯酸甲基酯(eicosapentaenoate methyl ester)、二十二碳六烯酸甲基酯(docosahexaenoate methyl ester)及二十三烷酸甲基酯(tricosanoate methyl ester)對照用標準品，其純度均大於99%。</u></p> <p>2.3. 器具及材料：</p> <p>2.3.1. 加熱器(Block heater)：50～200°C。</p> <p>2.3.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。</p> <p>2.3.3. 褐色玻璃瓶：15 mL，附Teflon瓶蓋。</p> <p>2.3.4. 褐色樣品瓶：2 mL，附瓶蓋。</p> <p>2.4. 標準溶液之配製：<u>稱取二十碳五烯酸甲基酯及二十二碳六烯酸甲基酯對照用標準品各約100 mg，精確稱定，以正己烷溶解，並定容至100 mL，作為混合標準溶液。</u></p> <p>2.5. 內部標準溶液之配製：<u>稱取二十三烷酸甲基酯對照用標準品約200 mg，精確稱定，以正己烷溶解，並定容至100 mL，供作內部標準溶液。</u></p>	<p>一、「適用範圍」、「檢驗方法」、「裝置」、「試藥」、「器具及材料」、「內部標準溶液之配製」及「檢液之調製」，依檢驗方法格式進行文字修正，另增列「試劑之調製」。</p> <p>二、「標準溶液之配製」修正對照用標準品之配製濃度，並增列內部標準品之配製。</p> <p>三、「鑑別試驗及含量測定」修正「氣相層析測定條件」之層析梯度，其餘依檢驗方法格式進行文字修正。</p>

100 mL。

2.5. 內部標準溶液之配製：

取甲基二十三烷酸酯內部標準品約50 mg，精確稱定，以正己烷溶解並定容至25 mL，供作內部標準溶液。

2.6. 標準溶液之配製：

取甲基二十碳五烯酸酯及甲基二十二碳六烯酸酯對照用標準品各約20 mg及內部標準品約10 mg，精確稱定，以正己烷溶解並定容至10 mL，供作標準溶液。

2.7. 檢液之調製：

取檢體約20 mg，精確稱定，置於玻璃瓶中，加入內部標準溶液1 mL及1 N氫氧化鈉甲醇溶液1 mL，充填氮氣，拴緊瓶蓋，旋渦混合30秒，置於加熱器中，以80°C皂化15分鐘，取出冷卻。加入14%三氟化硼甲醇溶液^(註)1 mL，充填氮氣，拴緊瓶蓋，旋渦混合30秒，置於加熱器中，以110°C酯化15分鐘，取出冷卻。精確加入正己烷1 mL，拴緊瓶蓋，旋渦混合1分鐘，加入飽和氯化鈉溶液3 mL，拴緊瓶蓋，輕輕混搖，靜置分層，取上層液，加入少量無水硫酸鈉混合，上清液供作檢液。
註：14%三氟化硼甲醇溶液為毒性化學物質，應於抽氣櫃內進行操作。

2.8. 鑑別試驗及脂肪酸含量測定：
精確量取檢液及標準溶液各1 μL，分別注入氣相層析儀中，依下列條件進行分析。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二十碳五烯酸或二十二碳六烯酸之含量：

2.8.1. 檢體中二十碳五烯酸或二十二碳六烯酸之含量百分比(%)

$$= \frac{A_x \times 100}{A_T - A_{is}}$$

A_x：甲基二十碳五烯酸酯或甲基二十二碳六烯酸酯之波峰面積

2.6. 檢液之調製：

稱取檢體約20 mg，精確稱定，加入內部標準溶液1 mL，置於褐色玻璃瓶中，加入1N氫氧化鈉甲醇溶液1 mL，充填氮氣，拴緊瓶蓋，以旋渦混合器震盪30秒，置於加熱器中，以80°C皂化15分鐘，取出冷卻。加入14%三氟化硼甲醇溶液^(註)1 mL，充填氮氣，拴緊瓶蓋，以旋渦混合器震盪30秒，置於加熱器中，以110°C酯化15分鐘，取出冷卻。精確量取正己烷1 mL，加入上述之褐色玻璃瓶內，拴緊瓶蓋，以旋渦混合器震盪1分鐘，加入飽和氯化鈉溶液6 mL，拴緊瓶蓋，輕輕震搖，靜置分層，取上層液至褐色樣品瓶中，加入少量無水硫酸鈉，供作檢液。

註：三氟化硼為有毒物質，相關實驗需於抽氣櫃內進行。

2.7. 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，參照下列測定條件進行氣相層析，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，求出檢體中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之含量：

2.7.1. 檢體中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之含量百分比(%)：

$$= \frac{A_x \times 100}{A_T - A_{is}}$$

A_x：二十碳五烯酸甲基酯或二十二碳六烯酸甲基酯之波峰面積。

A_T：檢液中所有脂肪酸之波峰面積總和。

A_{is}：內部標準品之波峰面積。

2.7.2. 檢體中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之含量(W_x)：

$$W_x \text{ (mg/g)} = \frac{A_x \times CF_x \times W_{is} \times 1000}{A_{is} \times W_s \times 1.04}$$

A_x：二十碳五烯酸甲基酯或二十二

四、「附註」刪除最低檢出限量。

五、增列參考文獻及參考層析圖譜。

六、增修訂部分文字。

A_T ：檢液中所有脂肪酸之波峰面積總和

A_{is} ：內部標準品之波峰面積

2.8.2. 檢體中二十碳五烯酸或二十二碳六烯酸之含量(W_x)

$$= W_x \text{ (mg/g)} = \frac{A_x \times CF_x \times W_{is} \times 1000}{A_{is} \times W_s \times 1.04}$$

A_x ：甲基二十碳五烯酸酯或甲基二十二碳六烯酸酯之波峰面積

A_{is} ：內部標準品之波峰面積

CF_x ：各甲基脂肪酸酯與內部標準品於火燄離子檢出器之相對反應係數，甲基二十碳五烯酸為0.99，甲基二十二碳六烯酸為0.97

W_{is} ：內部標準品之添加量(mg)

W_s ：檢體取樣量(mg)

1/1.04：各甲基脂肪酸酯轉換為脂肪酸之係數

氣相層析測定條件：

檢出器：火燄離子檢出器。

層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm \times 30 m。

層析管溫度：

初溫：175°C，35 min；

升溫速率：3°C/min；

終溫：230°C，30 min。

注入器溫度：250°C。

檢出器溫度：270°C。

注入量：1 μL 。

分流比：40：1。

移動相氣體及流速：氮氣，1.0 mL/min。

註：上述測定條件不適時，可依所使用之儀器，設定適合之測定條件。

附註：檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

AOAC International. 2005. Fatty acids in encapsulated fish oils and fish oil methyl and ethyl esters. AOAC Official Method 991.39.

參考層析圖譜

碳六烯酸甲基酯之波峰面積。

A_{is} ：內部標準品之波峰面積。

CF_x ：各脂肪酸甲基酯與二十三烷酸甲基酯在火燄離子檢出器之相對反應係數，二十碳五烯酸為0.99，二十二碳六烯酸為0.97。

W_{is} ：內部標準品之添加量(mg)。

W_s ：檢體取樣量(mg)。

1/1.04：二十碳五烯酸甲基酯及二十二碳六烯酸甲基酯轉變為脂肪酸之係數。

氣相層析測定條件：

層析管溫度：

初溫：200°C，8 min

溫度上升速率：10°C/min

終溫：220°C，40 min

檢出器溫度：270°C

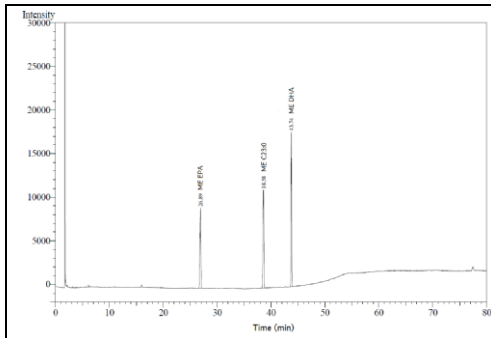
注入器溫度：250°C

移動相氣體氮氣流速：1.0 mL/min

分流比：40：1

附註：1. 本檢驗方法最低檢出限量為0.1%或1.0 mg/g。

2. 食品中若有影響檢驗結果之物質，應自行探討。



圖、甲基二十碳五烯酸酯與甲基二十二碳六烯酸酯標準品及甲基二十三烷酸酯內部標準品之GC圖譜