

111年度食品化學檢驗方法推廣訓練班

議 程

時間	課程內容	講師/主持人
9:30~10:00	報到	食品藥物管理署
10:00~10:10	主席致詞	食品藥物管理署 高雅敏 簡任技正
10:10~10:30	魚油中EPA及DHA之檢驗方法 1. 魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法 2. 魚油中乙基二十碳五烯酸酯及乙基二十二碳六烯酸酯之檢驗方法	許瀞尤 技士
10:30~10:40	實驗影片觀摩/休息	
10:40~11:00	食品中動物用藥殘留量檢驗方法 - 四環黴素類抗生素之檢驗	劉誌成 技士
11:00~11:10	實驗影片觀摩/休息	
11:10~11:30	綜合討論	食品藥物管理署 高雅敏 簡任技正

111年度食品化學檢驗方法 推廣訓練班

- 魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法
- 魚油中乙基二十碳五烯酸及乙基二十二碳六烯酸之檢驗方法

研究檢驗組 食品化學科
2022.11.18



衛 生 福 利 部
食 品 藥 物 管 理 署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

前言

- 魚油為 ω -3脂肪酸(EPA及DHA)主要攝取來源之一，已有許多研究報告指出，食用魚油對人體健康有許多益處，如預防心血管疾病、減少血液中三酸甘油酯、減少類風溼性關節炎發炎程度、幫助胎兒腦部發育及抗憂鬱等。



參考文獻：

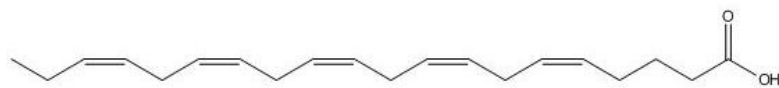
1. Daviglus, M. L., Stamler J., Orencia A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D. and Shekelle, R. B. 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infraction. N. Engl. J. Med. 336(15): 1046-1053.
2. Song, C., Zhang, X. Y. and Manku, M. 2009. Increased phospholipase A2 activity and inflammatory response but decreased nerve growth factor expression in the olfactory bulbectomized rat model of depression: effects of chronic ethyl-eicosapentaenoate treatment. J. Neurosci. 29(1): 14-22.



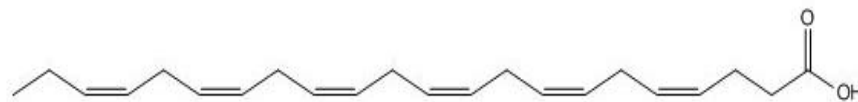
衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

魚油中EPA及DHA型態

脂肪酸

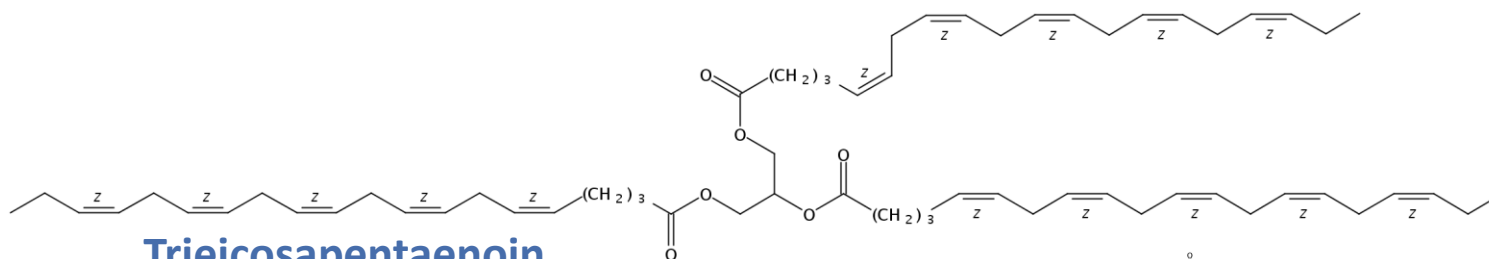


Eicosapentaenoic acid (EPA)

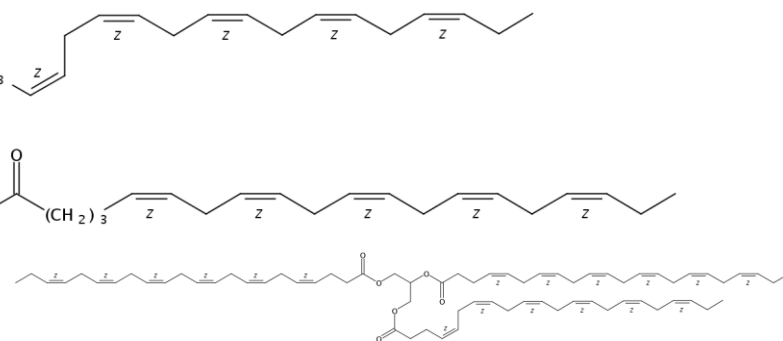


Docosahexaenoic acid (DHA)

三酸甘油酯

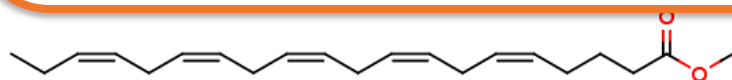


Trieicosapentaenoin

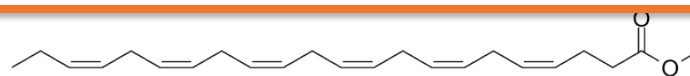


Tridocosahexaenoin

甲基酯

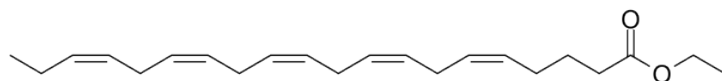


Methyl eicosapentaenoate

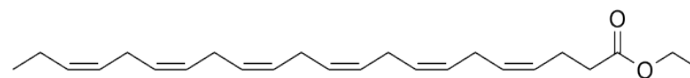


Methyl docosahexaenoate

乙基酯



Ethyl eicosapentaenoate



Ethyl docosahexaenoate

魚油中EPA及DHA型態

- **天然魚油**中EPA及DHA通常以**三酸甘油酯**型式存在，含量約為30%
- 為得到更高純度之EPA及DHA，業者常利用加工技術將魚油濃縮以提高EPA及DHA含量
 - － 日本業者發展出以化學反應得到高濃度乙基酯型式之EPA及DHA
 - － 部分業者將反應所得之高濃度乙基酯型式EPA及DHA添加於天然來源三酸甘油酯型式魚油中，以提高EPA及DHA總量



參考文獻：

1. Breivik, H. 2007. Concentrates. In "Long-chain omega-3 specialty oils". pp. 111-140. Breivik, H. ed. The Oily Press. Bridgewater, England.
2. von Schacky, C. 2006. A review of omega-3 ethyl esters for cardiovascular prevention and treatment of increased blood triglyceride levels. Vasc. Health Risk Manag. 2(3): 251-262.

相關規範

- 我國有關魚油之規範

- 「食品原料魚油之使用限制」 -

規定供食品原料及特定疾病配方食品使用之魚油，每日食用量規定EPA及DHA之總量分別為2 g及5 g以下。

- 「魚油健康食品規格標準」 -

規定魚油產品所含 ω -3脂肪酸應為三酸甘油酯型式，其純度(以EPA與DHA總和計算)應為30 ~ 50%，每日攝取量至少應達1.0 g，但不得超過2.0 g。

檢驗方法介紹

.....

公告方法- 魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法 (MOHWA0001.02)



衛 生 福 利 部
食 品 藥 物 管 理 署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

111年5月25日 公告修正

衛生福利部 公告

發文日期：中華民國111年5月25日
發文字號：衛授食字第1111900943號
附件：檢驗方法1份



主旨：修正「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」，並自即日生效。

依據：食品安全衛生管理法第三十八條

公告事項：修正「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」

適用範圍及檢驗方法原理

- 適用範圍

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

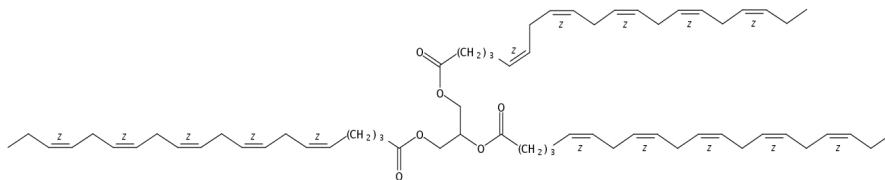
- 檢驗方法原理

樣品

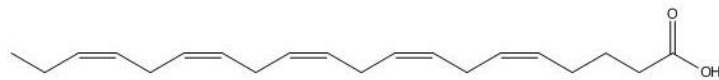
鹼水解

轉酯化

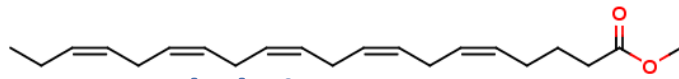
GC



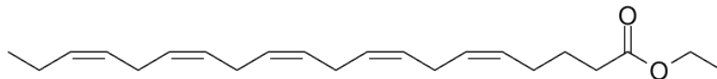
Trieicosapentaenoin



EPA



Methyl eicosapentaenoate



Ethyl eicosapentaenoate

1 N氫氧化鈉甲醇溶液 含14%三氟化硼甲醇溶液
80°C, 15 min 110°C, 15 min

Methyl
eicosapentaenoate



試藥

● 試藥

- 正己烷
- 氫氧化鈉
- 甲醇
- 氯化鈉
- 無水硫酸鈉
- 去離子水
- 含14%三氟化硼甲醇溶液(boron trifluoride in methanol)
- 對照用標準品
 - 甲基二十碳五烯酸酯 (methyl eicosapentaenoate)
 - 甲基二十二碳六烯酸酯(methyl docosahexaenoate)
- 內部標準品
 - 甲基二十三烷酸酯(methyl tricosanoate)



標準溶液配製

- 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。

- 標準溶液之配製 ➡ 定性

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。

不需製作標準曲線

檢驗流程

● 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

以 80°C皂化15分鐘，取出冷卻

加入14%三氟化硼甲醇溶液1 mL

充填氮氣，拴緊瓶蓋
旋渦混合30秒

以110°C酯化15分鐘，取出冷卻

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，
輕輕混搖，靜置分層

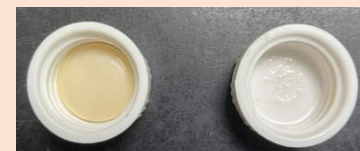
取上層液，加入少量無水硫酸鈉，
上清液供作檢液

**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。**



有墊片
(O)

無墊片
(X)



層析條件

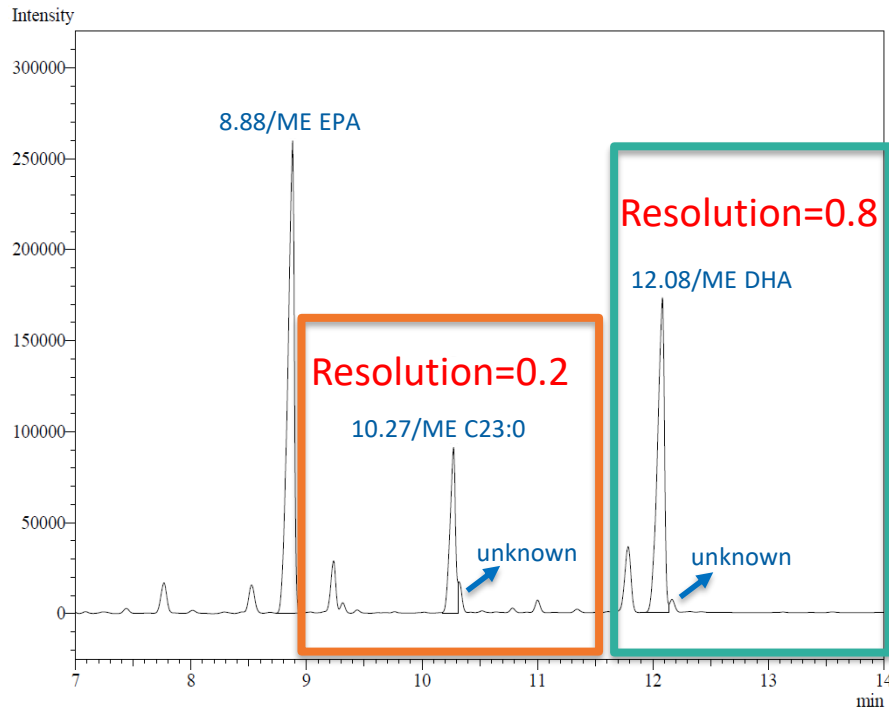
● 氣相層析測定條件

- 檢出器：火焰離子檢出器
- 層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m
- 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：氦氣，1.0 mL/min
- 層析管溫度：
 - 初溫：175°C，35 min
 - 升溫速率：3°C/min
 - 終溫：230°C，30 min

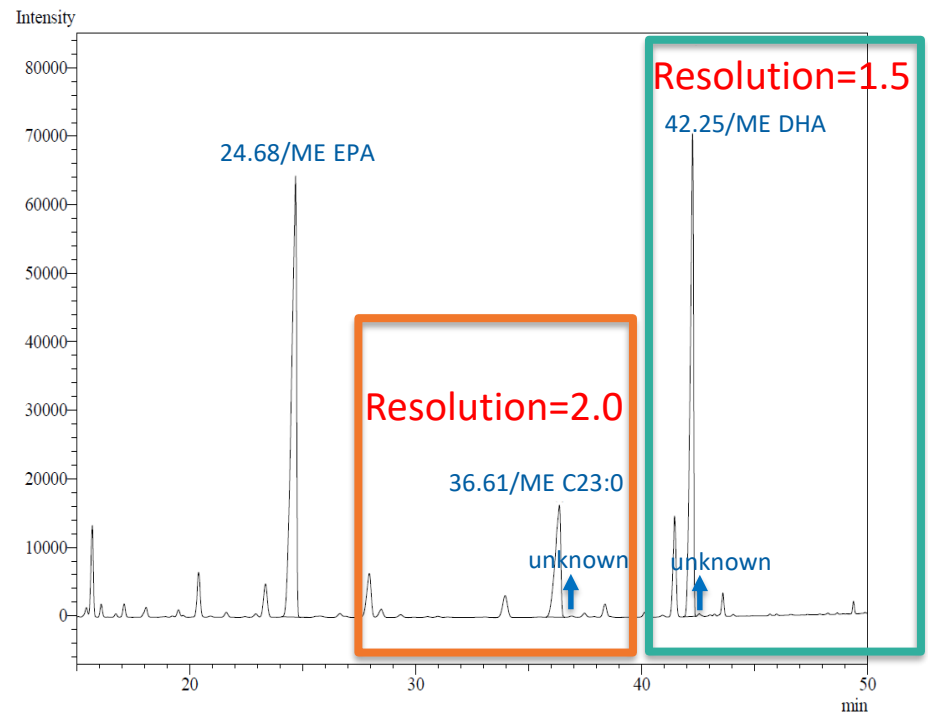


總分析時間83分鐘

方法修正前後圖譜比較



- 層析條件修正前
 - 初溫：200°C，8 min；
 - 升溫速率：10°C/min；
 - 終溫：220°C，40 min
- 總分析時間50分鐘



- 層析條件修正後
 - 初溫：175°C，35 min；
 - 升溫速率：3°C/min；
 - 終溫：230°C，30 min
- 總分析時間83分鐘

$$\text{解析度} = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{1}{2}(w_{b1} + w_{b2})} = \frac{\text{兩尖峰間距離}}{\text{平均尖峰寬度}}, R_s \geq 1.5$$

含量計算

- 檢體中二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)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

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

含量計算

- 檢體中二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)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

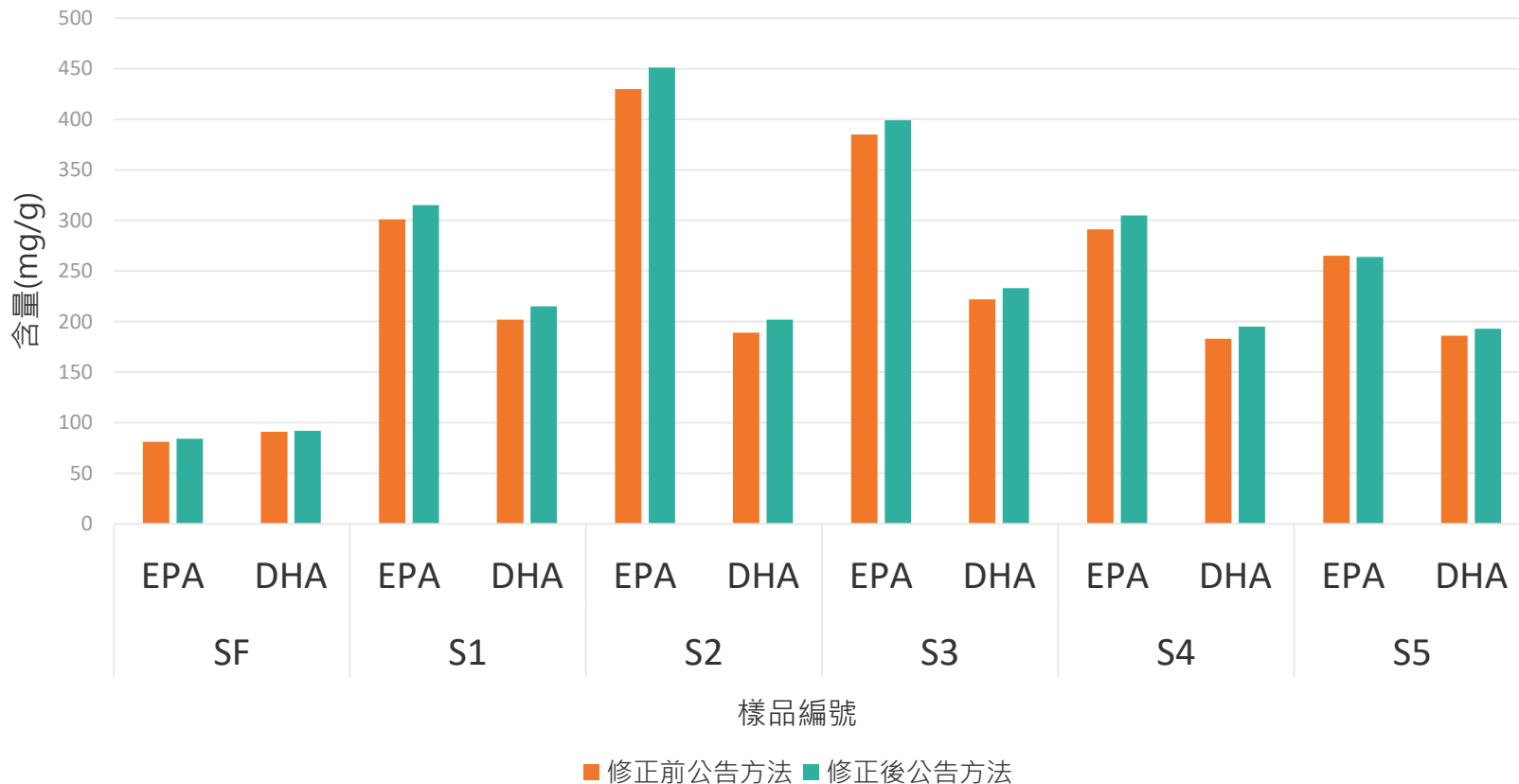

$$\frac{1}{1.04} \approx \frac{\text{各脂肪酸酯分子量}}{\text{各甲基脂肪酸酯分子量}}$$

修正後公告方法確效結果

脂肪酸	添加濃度 (mg/g)	同日間 (n=5)			異日間 (n=10)		
		平均回收率 (%)	變異係數 (%)	S/N	平均回收率 (%)	變異係數 (%)	S/N
EPA	2	92.9	2.1	16	93.3	3.1	13
DHA		93.8	1.2	27	94.5	2.7	22
EPA	50	91.1	0.5	-	91.8	1.5	-
DHA		94.0	0.3	-	94.9	0.4	-
EPA	250	91.9	1.3	-	91.6	1.7	-
DHA		94.1	1.6	-	93.9	2.1	-

修正前後公告方法檢驗市售產品結果

EPA及DHA含量



修正後之EPA檢測值較修正前提提高約0~5%，DHA檢測值亦提高約1~7%

檢驗方法介紹

.....

建議方法-
魚油中乙基二十碳五烯酸酯及乙基二十二碳六烯酸酯之檢驗方法
(TFDAO0036.01)



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

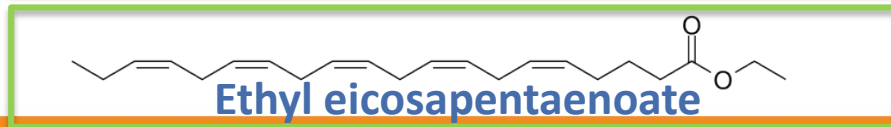
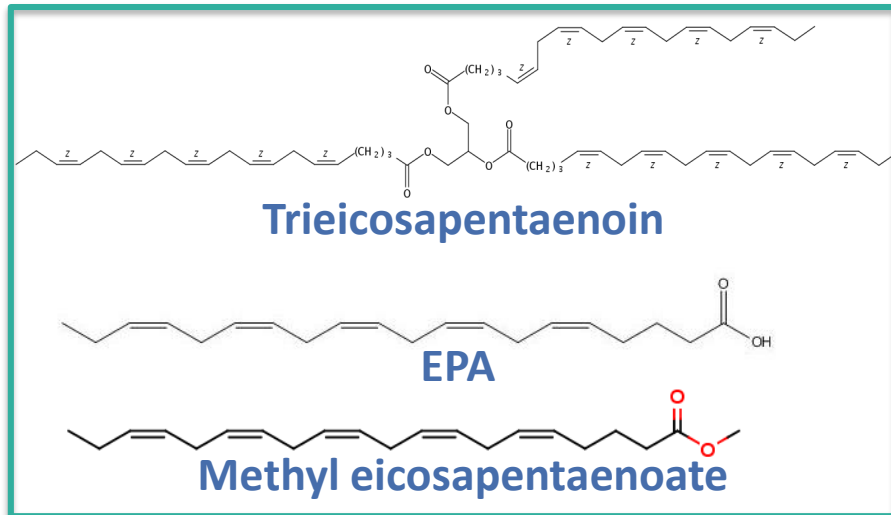
適用範圍及檢驗方法原理

- 適用範圍

本檢驗方法適用於魚油中乙基二十碳五烯酸酯(ethyl eicosapentaenoate)及乙基二十二碳六烯酸酯(ethyl docosahexaenoate)之檢驗。

- 檢驗方法原理

樣品

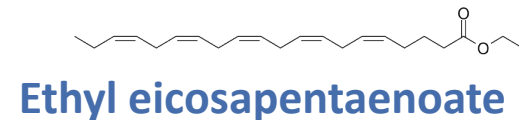
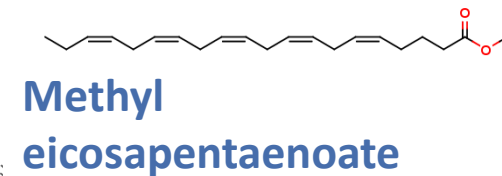


轉酯化

GC

25%氫氧化四甲基胺之甲醇溶液

常溫, 5 min



轉酯試劑

- 14%三氟化硼(BF_3)甲醇溶液(公告方法)

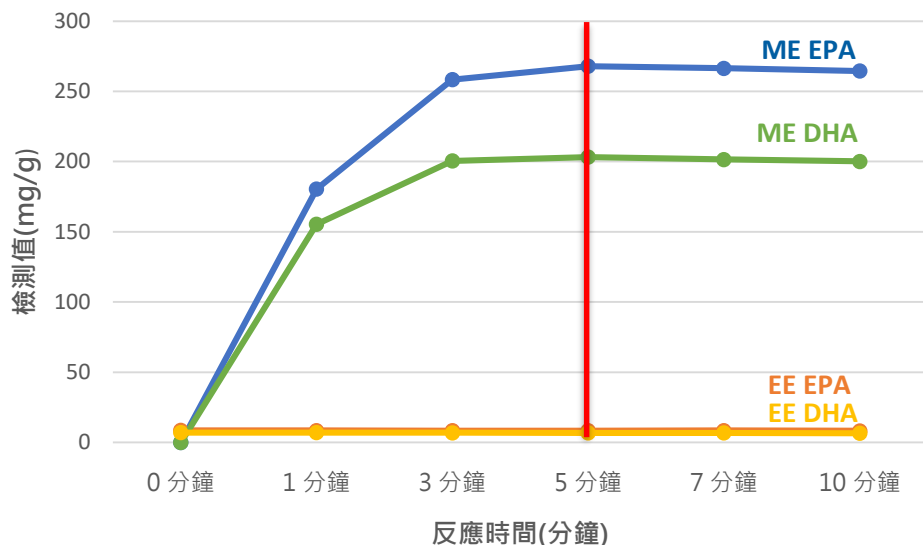
- 將油脂中三酸甘油酯、乙基酯或游離態等型式之脂肪酸，經氫氧化鈉甲醇溶液高溫皂化，再以14% BF_3 甲醇溶液進行甲基酯化反應，由檢測甲基酯型式脂肪酸經係數換算得到EPA及DHA含量。

- 25%氫氧化四甲基銨(TMAH)甲醇溶液(建議方法)

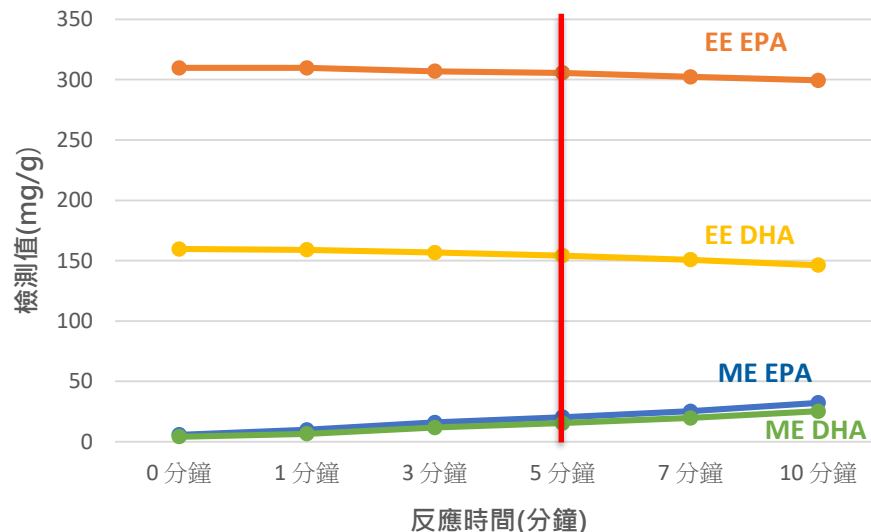
- TMAH方法於室溫進行反應，可將油脂中三酸甘油酯型式、乙基酯及游離態型式脂肪酸轉變成甲基酯型式。
- 乙基酯型式脂肪酸作用速率較三酸甘油酯緩慢，針對TMAH反應時間條件測試，以含有乙基酯型式EPA或DHA (>7 mg/g)之魚油，經TMAH檢驗方法反應5分鐘後，仍有97%以上之乙基酯型式EPA或DHA存在，故可作為鑑別並定量油脂中三酸甘油酯型式及乙基酯型式脂肪酸之方法。

TMAH轉酯化反應時間條件測試

魚油檢體A



魚油檢體B



- 魚油檢體A【主要為三酸甘油酯型式】：
經TMAH於室溫進行反應**5分鐘**後，可將油脂中**三酸甘油酯型式**及**游離態型式脂肪酸**轉變成**甲基酯型式**。
- 魚油檢體B【主要為乙基酯型式】：
經TMAH於室溫進行反應**5分鐘**後，仍有**97%以上之乙基酯型式EPA或DHA**存在。

試藥

- 試藥

- 乙醚
- 正己烷
- 氯化鈉
- 無水硫酸鈉
- 去離子水
- 含25%氫氧化四甲基銨之甲醇溶液(tetramethylammonium hydroxide in methanol)
- 對照用標準品
 - 乙基二十碳五烯酸酯(ethyl eicosapentaenoate)
 - 乙基二十二碳六烯酸酯(ethyl docosahexaenoate)
- 內部標準品
 - 甲基二十三烷酸酯(methyl tricosanoate)



標準溶液配製

- 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。

- 標準溶液之配製

稱取乙基二十碳五烯酸酯及乙基二十二碳六烯酸酯對照用標準品各約 50 mg，精確稱定，分別以正己烷溶解並定容至10 mL，作為標準原液。臨用時取適量各標準原液混合，加入內部標準溶液，以正己烷稀釋至10 ~ 2000 $\mu\text{g/mL}$ (含內部標準品濃度250 $\mu\text{g/mL}$)，供作標準溶液。

檢驗流程

● 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及乙醚 3 mL

拴緊瓶蓋，旋渦混合

加入含25%氫氧化四甲基胺之甲醇溶液
0.1 mL，旋渦混合

於25°C甲酯化反應5分鐘
(反應期間不時振搖)

加入去離子水3 mL，旋渦混合30秒

加入飽和氯化鈉溶液1 mL，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

若魚油檢體EPA及DHA含量高，超過
標準曲線濃度時，需先適當稀釋再繼續進行前處理

含25%氫氧化四甲基胺之甲醇溶液為
毒性化學物質，應於抽氣櫃內進行操作

終止反應

層析條件

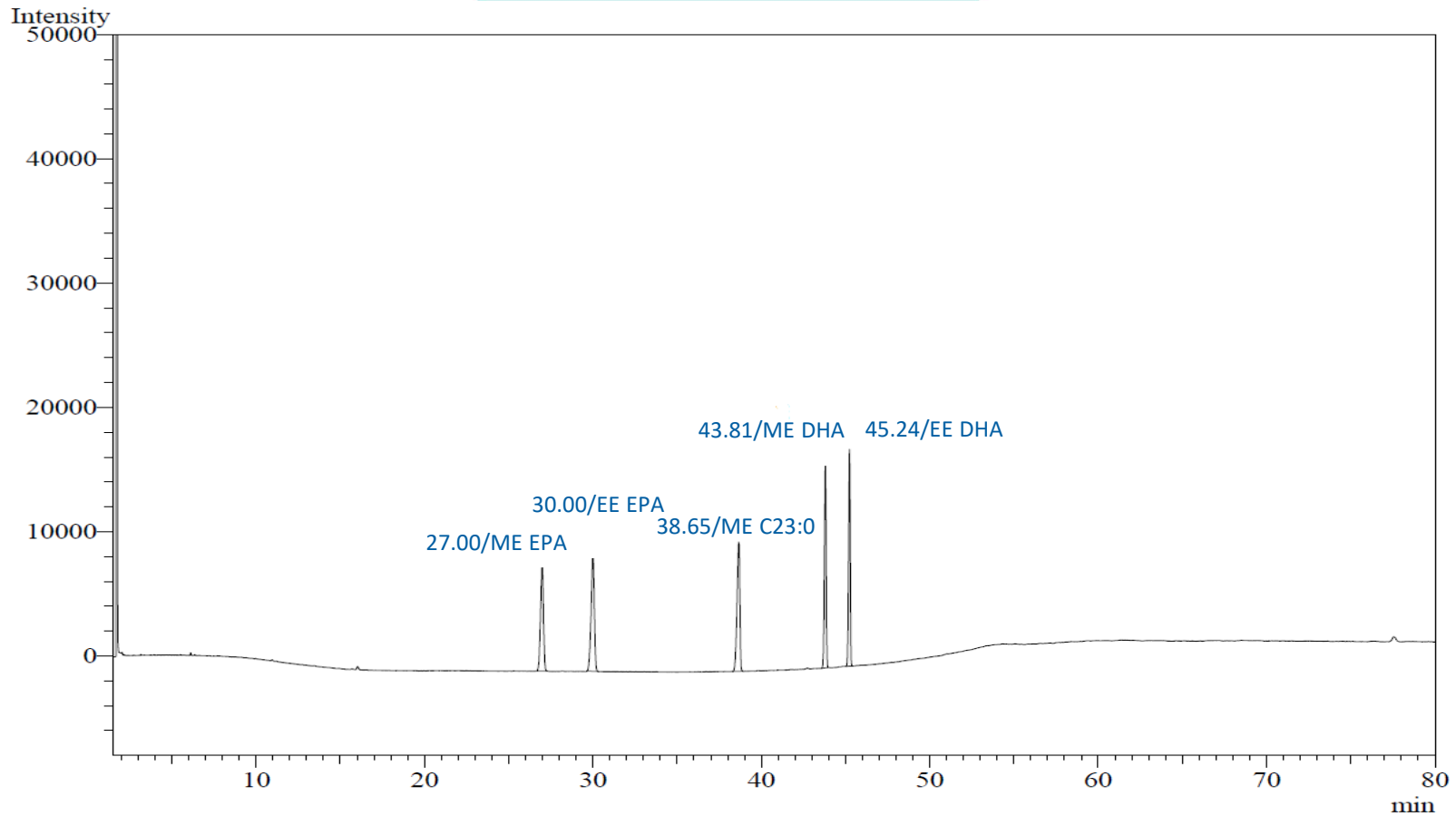
● 氣相層析測定條件

- 檢出器：火焰離子檢出器
- 層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm $\times$ 30 m
- 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：氦氣，1.0 mL/min
- 層析管溫度：
 - 初溫：175°C，35 min
 - 升溫速率：3°C/min
 - 終溫：230°C，30 min

總分析時間83分鐘

與公告方法相同

圖譜



圖、甲基二十碳五烯酸酯標準品(ME EPA)、乙基二十碳五烯酸酯標準品(EE EPA)、
甲基二十三烷酸酯內部標準品(ME C23:0)、甲基二十二碳六烯酸酯標準品(ME
DHA)及乙基二十二碳六烯酸酯標準品(EE DHA)之GC圖譜

含量計算

- 檢體中乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯之含量(%)

$$= \frac{C \times V}{M \times 10}$$

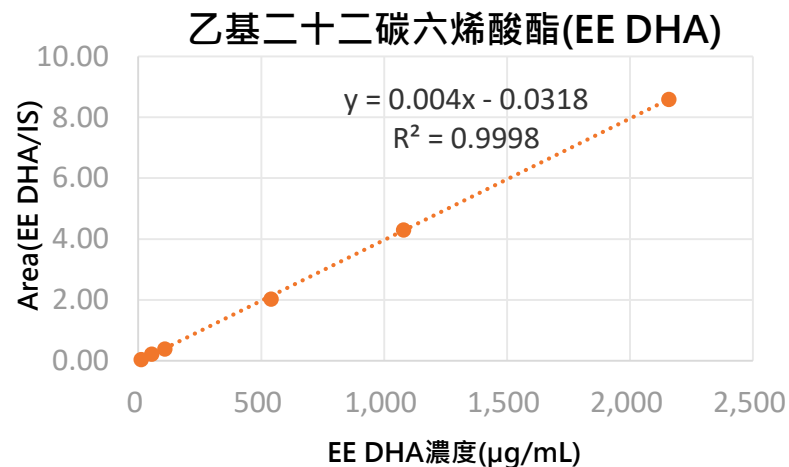
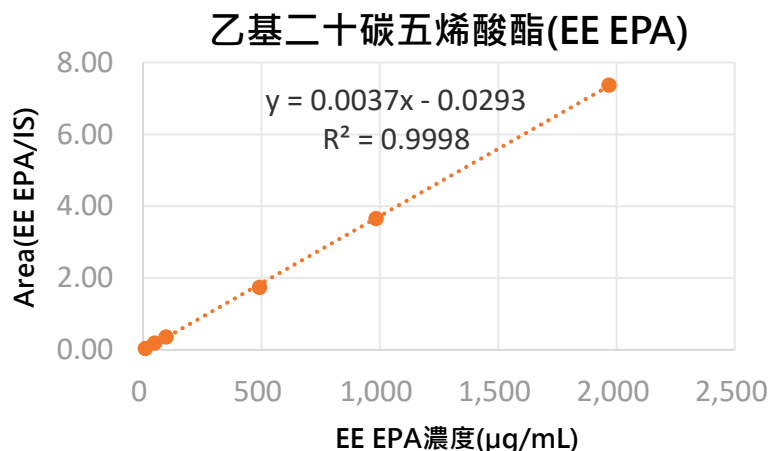
C：由標準曲線求得檢液中乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯之濃度(μg/mL)

V：萃取檢體之乙醚及內部標準品溶液之體積(4 mL)

M：取樣分析檢體之重量(mg)

建議方法確效結果

標準曲線



重複性及添加回收試驗

基質	脂肪酸	添加濃度 (mg/g)	同日間 (n=5)	
			平均回收率(%)	變異係數(%)
魚油	EE EPA	5	90.8	2.5
	EE DHA		95.2	1.4
	EE EPA	10	91.1	0.2
	EE DHA		94.0	0.7
	EE EPA	20	93.6	1.1
	EE DHA		92.7	1.7

重複性及添加回收試驗

基質	脂肪酸	添加濃度 (mg/g)	同日間 (n=5)		S/N ratio	定量極限 (mg/g)
			平均回收率(%)	變異係數(%)		
葡萄籽油	EE EPA EE DHA	2	91.1 95.0	0.9 4.3	12.5 17.8	2

方法比較

方法	公告方法		建議方法
	修正前	修正後	
層析管柱	DB-23 (內膜厚度0.25 μm , 內徑0.25 mm $\times$ 30 m)	DB-23 (內膜厚度0.25 μm , 內徑0.25 mm $\times$ 30 m)	DB-23 (內膜厚度0.25 μm , 內徑0.25 mm $\times$ 30 m)
內標	C23:0	C23:0	C23:0
轉酯試劑	14%BF ₃ 甲醇溶液	14%BF ₃ 甲醇溶液	25%TMAH甲醇溶液
前處理	取樣，加內標 ↓ 加入1N氫氧化鈉甲醇溶液，加熱15 min ↓ 加入14%BF ₃ -MeOH，加熱15 min ↓ 加入正己烷 ↓ 加入飽和氯化鈉溶液、少量無水硫酸鈉 ↓ 取上層液 GC-FID		取樣，加內標 ↓ 加入乙醚 ↓ 加入25%TMAH-MeOH ↓ 室溫反應 5分鐘 ↓ 加入去離子水 ↓ 加入飽和氯化鈉溶液、少量無水硫酸鈉 ↓ 取上層液 GC-FID
層析條件	初溫：200°C，8 min 升溫速率：10°C/min 終溫：220°C，40 min	初溫：175°C，35 min 升溫速率：3°C/min 終溫：230°C，30 min	初溫：175°C，35 min 升溫速率：3°C/min 終溫：230°C，30 min
層析時間	50 min	83 min	83 min
計算	反應轉換係數換算	反應轉換係數換算	標準曲線法
備註	將所有型式之脂肪酸全部甲基酯化， 可測得EPA及DHA含量		可測得乙基酯型式之EPA與DHA及其含量 ，但隨反應時間遞增，乙基酯型式之脂肪酸亦可被甲基酯化

常見問答

.....



衛 生 福 利 部
食 品 藥 物 管 理 署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>

常見問答-1

Q1 :

公告方法「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」及建議方法「魚油中乙基二十碳五烯酸酯及乙基二十二碳六烯酸酯之檢驗方法」。請問：兩者方法進行檢驗，檢驗結果之差異？若要申請健康食品，應以何種方法進行檢測較為合適？

A1 :

- 公告方法係將魚油中多種形態之EPA及DHA均衍生化為甲酯型式之EPA及DHA，再經換算為EPA及DHA含量；建議方法則是測定魚油中乙基酯型式之EPA及DHA含量。
- 申請健康食品，若欲得知魚油中全部EPA及DHA含量，可採用前者，或依產品內容及其訴求選擇所需之檢驗方法。

常見問答-2

Q2 :

針對公告方法「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」：

- 方法針對甲酯化EPA與DHA的定量是否可以適用於乙酯化的EPA與DHA，若可以，其CF_x應如何測得？
- 另外其乙酯化EPA與DHA轉變為EPA與DHA的係數為何？

A2 :

- 公告方法係將魚油中之三酸甘油酯、乙基酯或游離態等型式之脂肪酸皆甲酯化後，由檢測之甲基酯型式脂肪酸經係數換算得到EPA及DHA含量。若要檢測乙酯型式脂肪酸可參考建議方法，該方法係使用標準曲線法進行含量計算，故不需測得CF_x。

常見問答-2

A2 :

- 檢體中二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)之含量(W_x) :

$$W_x \text{ (mg/g)} = \frac{C \times V}{M \times R}$$

C : 由標準曲線求得檢液中乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯之濃度(μg/mL)

V : 萃取檢體之乙醚及內部標準品溶液之體積(4 mL)

M : 取樣分析檢體之重量(mg)

R : 各乙基酯轉換為脂肪酸之係數為1.08


$$\frac{1}{1.08} \approx \frac{\text{各脂肪酸酯分子量}}{\text{各乙基脂肪酸酯分子量}}$$

常見問答-3

Q3 :

有關111年5月25日公告修正之「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法(MOHWA0001.02)」，有以下問題請教：

- **方法刪除檢出限量**，也未訂有訂量極限，是因魚油中的DHA與EPA含量高，所以才不要求定量極限嗎？定量極限由各實驗室自己評估制定嗎？
- 層析條件的分析時間比原方法更長，請問是什麼原因？

A3 :

- 依據本署「食品化學檢驗方法之確效規範」中附註2：「**檢驗方法應用之檢體濃度遠大於方法推估之定量極限時，則無需評估方法之定量極限。**」。故台端得自行評估訂定魚油中DHA與EPA之檢測範圍。
- 由於原公告「魚油中二十碳五烯酸及二十二碳六烯酸之檢驗方法」之層析條件，內標(C23:0)及DHA波峰易受基質干擾，**為提升解析度，調整層析條件，故整體層析時間延長至83分鐘。**



感謝聆聽

.....



衛生福利部
食品藥物管理署
Taiwan Food and Drug Administration

<http://www.fda.gov.tw/>