

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

Method of Test for Ethyl Eicosapentaenoate and Ethyl Docosaheptaenoate in Fish Oil

1. 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 docosaheptaenoate)之檢驗。
2. 檢驗方法：檢體經水解、轉酯化後，以氣相層析儀(gas chromatograph, GC)分析之方法。
 - 2.1. 裝置：
 - 2.1.1. 氣相層析儀：
 - 2.1.1.1. 檢出器：火焰離子檢出器(flame ionization detector, FID)。
 - 2.1.1.2. 層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 μm ，內徑0.25 mm \times 30 m，或同級品。
 - 2.1.2. 旋渦混合器(Vortex mixer)。
 - 2.2. 試藥：乙醚、正己烷、氯化鈉、無水硫酸鈉及含25%氫氧化四甲基銨之甲醇溶液(tetramethylammonium hydroxide in methanol)均採用試藥特級；去離子水(比電阻於25°C可達18 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上)；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；甲基二十三烷酸酯(methyl tricosanoate)內部標準品。
 - 2.3. 器具及材料：
 - 2.3.1. 容量瓶：25 mL及50 mL，褐色。
 - 2.3.2. 玻璃瓶：25 mL，褐色，附Teflon瓶蓋。
 - 2.4. 飽和氯化鈉溶液之調製：

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。
 - 2.5. 內部標準溶液之配製：

稱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50 mL，供作內部標準溶液。
 - 2.6. 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (含內部標準品濃度250 $\mu\text{g}/\text{mL}$)，供作標準溶液。
 - 2.7. 檢液之調製：

稱取檢體約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，旋渦混合使之溶解，加入含25%氫氧化四甲基胺之甲醇溶液^(註) 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，以終止反應，加入飽和氯化鈉溶液1 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：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。

2.8. 標準曲線之製作：

精確量取標準溶液各1 µL，分別注入氣相層析儀中，依下列條件進行分析。就乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯與內部標準品之波峰面積比，與對應之乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯濃度，分別製作標準曲線。

氣相層析測定條件：

層析管：DB-23毛細管，內膜厚度0.25 µm，內徑0.25 mm × 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：氬氣，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。

2.9. 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2.8.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乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯之含量(%)：

$$\text{檢體中乙基二十碳五烯酸酯或乙基二十二碳六烯酸酯之含量(\%)} = \frac{C \times V}{M \times 10}$$

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($\mu\text{g/mL}$)

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)

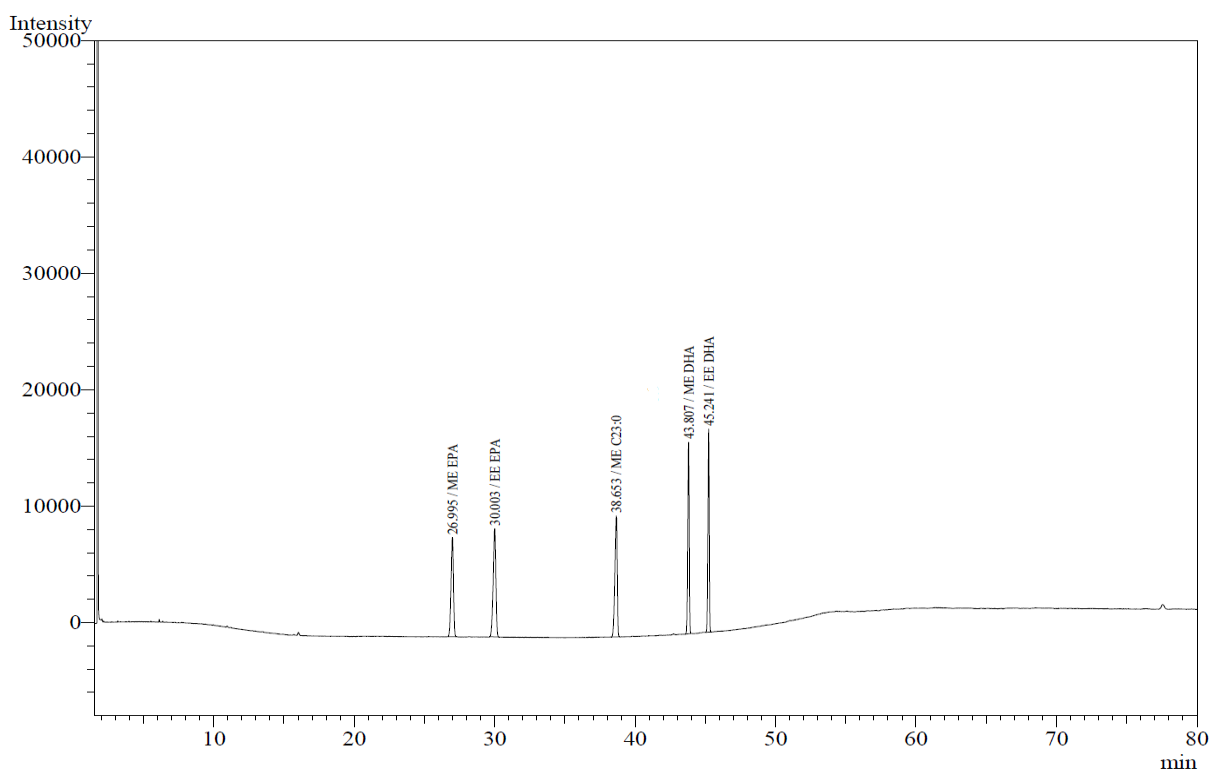
附註：1. 本檢驗方法之定量極限，乙基二十碳五烯酸酯及乙基二十二碳六烯酸酯均為0.2%。

2. 檢體中有影響檢驗結果之物質時，應自行探討。

參考文獻：

Tsai, C. J., Liu, C. C., Hung, L. B. and Pan, B. S. 2012. TMAH-catalyzed transesterification of EPA and DHA in encapsulated fish oil products. J. Am. Oil Chem. Soc. 89: 9-16.

參考層析圖譜



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