

# 气相色谱法测定藻油中 DHA 含量的 不确定度的评定

张喜金\*, 苏昭仑, 黄康惠

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

**摘要:** **目的** 对采用气相色谱法测定藻油中 DHA 含量的不确定度进行分析, 找出影响不确定度的因素, 为评价其测定方法和检测结果的可靠性提供依据。 **方法** 根据 JJF1059.1-2012《测量不确定度的评定与表示》的规定, 对测定过程中重复测量、样品溶液的配制、标准溶液的配制、检测仪器等引入的不确定度分量进行评定。 **结果** 测定结果合成不确定度为 0.9%, 扩展不确定度为 1.8%。藻油中 DHA 含量测定结果为  $(28.5 \pm 0.5)$  g/100 g ( $k=2$ ), 即有 95% 可能性为 28.0~29.0 g/100 g。 **结论** 标准溶液和样品溶液的配制是影响不确定度的主要因素, 使用校准级别高的容量瓶以及精密度高的天平仪器, 可有效减少此类测量的不确定度, 说明建立的不确定度评定方法可用于气相色谱方法测定藻油中 DHA 含量结果的判断。

**关键词:** 气相色谱法; DHA; 不确定度

## Assessment of content uncertainty of DHA in algal oil by gas chromatography

ZHANG Xi-Jin\*, SU Zhao-Lun, HUANG Kang-Hui

(By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China)

**ABSTRACT: Objective** To analyze the content uncertainty of DHA in algal oil by gas chromatography (GC), and find out the influence factors of the uncertainty, so as to provide the basis for the evaluation of the measurement method and the reliability of the test results. **Methods** The uncertainty components were assessed through the determination of the process of repeated measurement, the preparation of sample solution, the preparation of standard solutions and testing instruments according to regulation of JJF1059.1-2012 "Evaluation and Expression of Uncertainty in Measurement". **Results** The synthetic uncertainty was 0.9%, and the expanded uncertainty was 1.8%. The content of DHA in algal oil was  $(28.5 \pm 1.8)$  g/100 g ( $k=2$ ), and it had 95% probability of 28.0~29.0 g/100 g. **Conclusion** Preparation of standard solutions and sample solution are the main factors of uncertainty. The high-level calibration flask and high precision balance instrument should be used, which can effectively reduce the measurement uncertainty. The uncertainty assessment method can be used for the judgment of determining DHA content in algal oil by GC.

**KEY WORDS:** gas chromatography; DHA; uncertainty

## 1 引言

藻油是一种微藻提取得到的天然保健食品, 富

含  $\omega$ -3 类高度不饱和脂肪酸, 主要包含二十二碳六烯酸(DHA)和二十二碳五烯酸(DPA), 二十碳五烯酸(EPA)含量却非常低<sup>[1]</sup>。其中, DHA 由于具有 6 个不

\*通讯作者: 张喜金, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 215865748@qq.com

\*Corresponding author: ZHANG Xi-Jin, By-Health Co., Ltd., Zhuhai 519040, China. E-mail: 215865748@qq.com

饱和键的特有结构,对人体健康有特殊的作用和影响,是人体必需的多不饱和脂肪酸,对人体有重要的生理调节功能。DHA 是大脑、神经、视觉细胞中重要的脂肪酸成分,能促进婴幼儿的脑部和视力的技能发育,有利于智力、学习和记忆能力的提高。Boucher 等<sup>[2]</sup>的研究进一步证实了 DHA 对儿童的记忆力有积极的作用。DHA 还能提高婴幼儿视觉的敏锐度<sup>[3-5]</sup>、促进婴幼儿的生长发育<sup>[6,7]</sup>、提高婴幼儿认知能力的发展。此外,DHA 对成人也具有重要的保健作用,能够降血压、降血脂、降胆固醇<sup>[8,9]</sup>。同时,DHA 在延缓衰老<sup>[10]</sup>、预防神经性疾病(如预防老年痴呆<sup>[11,12]</sup>、减缓躁郁症病情<sup>[13]</sup>等)、抗癌、抑制肿瘤<sup>[14]</sup>、预防骨质疏松<sup>[15]</sup>、预防糖尿病<sup>[16]</sup>、抗炎症等方面也有明显的作用。所以,对于藻油中 DHA 含量的控制显得尤为重要。目前检测 DHA 的方法主要是气相色谱法,该方法具有快速、简便、准确的优点。测量不确定度是对测量结果质量的定量表征,可用于评估定量方法可靠性和测量结果的可信程度<sup>[17]</sup>。因此,对藻油中 DHA 进行不确定度评定具有重要意义。

## 2 材料与方法

### 2.1 实验仪器

气相色谱仪(具 FID 测器,美国安捷伦有限公司); XP-205 电子天平(德国赛多利斯公司,0.01 mg)。

### 2.2 标准与试剂

DHA 甲酯标准品(NU-CHEK,纯度:99.0%);汤臣倍健 DHA 藻油软胶囊(市售);正己烷(成都市科龙化工试剂产,色谱纯);三氟化硼甲醇溶液(德国 CNW,分析纯);氯化钠(广州化学试剂产)。

### 2.3 色谱条件

进样口:230 °C;分流比:10:1;进样量:1 μL。色谱柱:流速 2.0 mL/min;Agilent, DB-WAX, 30 m, 250 μm, 0.25 μm。柱箱:170 °C,保持 2 min;以 30 °C/min,升至 200 °C,保持 8 min;以 30 °C/min,升至 230 °C,保持 5 min,以 30 °C/min,升至 240 °C,保持 2.5 min。FID:260 °C;氢气 30 mL/min;空气 400 mL/min;尾吹 30 mL/min。

### 2.4 对照品溶液的制备

精密称取 15 mg DHA 甲酯,置 10 mL 容量瓶,加正己烷定容,摇匀即可。

## 2.5 样品溶液的制备

精密称取 0.1 g 样品,置 50 mL 比色管,加 4 mL KOH 甲醇溶液(0.5 mol/L),于 65 °C 水浴 10 min,振荡至完全皂化(约 10 min),再加 4 mL 三氟化硼甲醇溶液(14%),摇匀,于 65 °C 水浴 10 min,精密加入正己烷 10 mL,猛烈振摇 30 s,加 5 mL 饱和 NaCl 水溶液,猛烈振摇 30 s,静置,取上清。

## 2.6 测定

待仪器稳定后,注入标准溶液和试样,根据测定的标准溶液和试样的峰面积,按照外标法计算出试样的含量。

## 3 结果与分析

### 3.1 量化不确定度的来源

#### 3.1.1 本研究主要涉及的测量过程

(1)试样重复测定时,总重复性引起的不确定度  $u_r(x_1)$ ; (2)标准物质引起的标准不确定度  $u_r(x_2)$ ; (3)样品引起的标准不确定度  $u_r(x_3)$ ; (4)仪器(气相色谱仪)引起的标准不确定度  $u_r(x_4)$ 。

根据以上分析,不确定度来源如图的因果图所示。

#### 3.1.2 不确定度传播律

由于数学模型是非线性模型,采用相对不确定度合成公式:

$$u_{cr}(x)=[u_r^2(x_1)+u_r^2(x_2)+u_r^2(x_3)+u_r^2(x_4)]^{1/2}$$

### 3.2 量化不确定度分量

3.2.1 试样重复测定时,总重复性引起的标准不确定度分量  $u_r(x_1)$

$u_r(x_1)$ 包括:人员、环境、仪器重复性等因素引起的不确定度;天平重复称量引起的不确定度等。综合起来,在结果的精密度得到充分的体现,所以本法按 GB/T 5009.168-2003 的要求,通过对同一试样进行实验室内部比对试验,得出一组数据,见表 1。

DHA 含量测量单次的标准偏差为:

$$S_1 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 0.2$$

标准不确定度: $u(x_{3.2.1}) = \frac{S_1}{\sqrt{n}} = 0.2/\sqrt{7} = 0.1$

相对标准不确定度为: $u_r(x_{3.2.1}) = \frac{u(x_{3.2.1})}{\bar{x}} = 0.1/28.5 \times 100\% = 0.4\%$

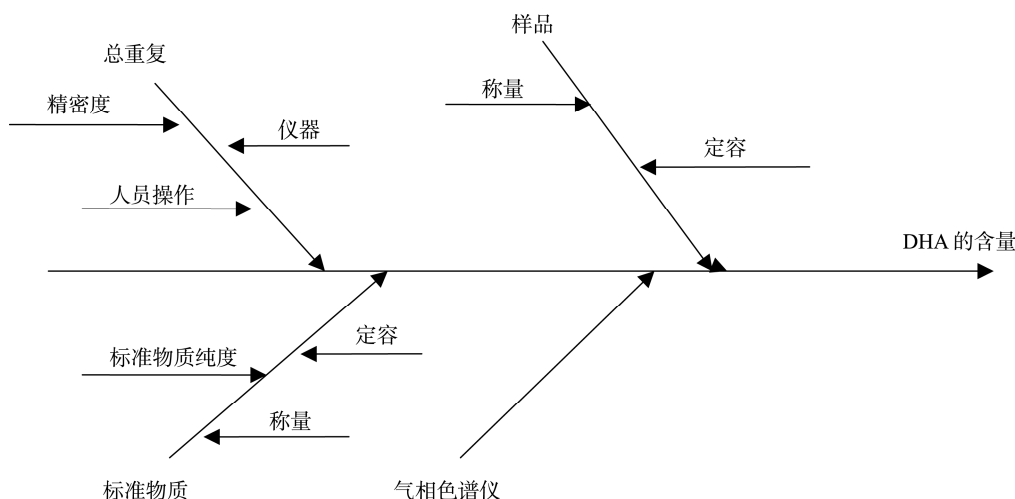


图 1 DHA 试样有效成分含量测定的不确定度来源

Fig. 1 Source of uncertainty for determination of active components in DHA

表 1 样品重复测定结果(n=7)  
Table 1 The repetitive determination results of sample (n=7)

序号	1	2	3	4	5	6	7	平均
含量(g/100 g)	28.4	28.5	28.2	28.7	28.4	28.5	28.6	28.5

此数值可作为测量重复性的方法确认结果, 以后评定可采用此数据。

$$u_r(rep) = u_r(x_{3.2.1}) = 0.4\%$$

在实际工作过程中, 当测定某藻油软胶囊样品中 DHA 含量 2 次时, 取其算术平均值作为测量结果, 故测定重复性引起的标准不确定度分量为:

$$u_r(x_1) = u_r(x_{3.2.1}) / \sqrt{2} = 0.4\% / \sqrt{2} = 0.3\%$$

### 3.2.2 标准物质引起的标准不确定度分量 $u_r(x_2)$

#### 3.2.2.1 标准物质含量引入的不确定度 $u_r(x_{3.2.2.1})$

根据 DHA 甲酯标准物质证书中提供的信息, DHA 甲酯标准物质扩展不确定度为 0.5%,  $k=2$ , 按正态分布, 纯度 99%, 则有:

$$u_r(x_{3.2.2.1}) = \frac{U}{k} \times \frac{1}{0.99} = 0.5\% / (2 \times 0.99) = 0.3\%$$

#### 3.2.2.2 标准物质称量引入的不确定度 $u_r(x_{3.2.2.2})$

用电子天平进行称量, DHA 甲酯标准物质重量  $m=0.01589$  g; 天平的校准证书给出的测量结果示值误差的扩展不确定度  $U=0.02$  mg,  $k=2$ , 属正态分布, 则有:

$$\text{标准不确定度为: } u(x_{3.2.2.2}) = \frac{U}{k} = 0.02 \text{ mg} / 2 =$$

0.00001 g

相对标准不确定度为:  $u_r(x_{3.2.2.2}) = 0.00001 / 0.01589 = 0.07\%$

#### 3.2.2.3 溶液定容过程引起的不确定度 $u_r(x_{3.2.2.3})$

溶液定容过程引起的不确定度主要由 10 mL 单标线容量瓶 (A 级) 引入的不确定度。

##### 3.2.2.3.1 10 mL 容量瓶校准产生的标准不确定度 $u_r(x_{3.2.2.3.1})$

按照 10 mL 单标线容量瓶的校准证书知, 实验中所用的 10 mL 单标线容量瓶都属于 A 级测量结果的扩展不确定度  $U=0.007$  mL,  $k=2$ , 属于正态分布, 则有:

$$\text{标准不确定度为: } u(x_{3.2.2.3.1}) = \frac{U}{k} = 0.007 / 2 = 0.004 \text{ mL}$$

相对标准不确定度为:  $u_r(x_{3.2.2.3.1}) = 0.004 / 10 = 0.04\%$

##### 3.2.2.3.2 溶液温度与校准温度不同产生的标准不确定度 $u_r(x_{3.2.2.3.2})$

假设溶液与校准温度的差异为  $\pm 5$  °C, 容量瓶的体积为 10 mL, 正己烷体积膨胀系数  $\alpha$  为  $(1.36 \times 10^{-3}) / ^\circ\text{C}$ , 正己烷的体积膨胀明显大于玻璃的体

积膨胀,因此只需考虑正己烷的体积膨胀即可,按矩形分布,取 $k=\sqrt{3}$ ,则有:

标准不确定度为: $u(x_{3.2.2.3.2})=10\times 5\times 1.36\times 10^{-3}/\sqrt{3}=0.04\text{ mL}$

相对标准不确定度为: $u_r(x_{3.2.2.3.2})=0.04/10=0.4\%$

10 mL 单标线容量瓶产生的合成相对标准不确定度:

$$u_r(x_{3.2.2.3}) = \sqrt{u_r^2(x_{3.2.2.3.1}) + u_r^2(x_{3.2.2.3.2})} = \sqrt{(0.04\%)^2 + (0.4\%)^2} = 0.5\%$$

由上面分析可得, DHA 甲酯标准物质引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(x_2) = \sqrt{u_r^2(x_{3.2.2.1}) + u_r^2(x_{3.2.2.2}) + u_r^2(x_{3.2.2.3})} = \sqrt{(0.3\%)^2 + (0.07\%)^2 + (0.5\%)^2} = 0.6\%$$

3.2.3 DHA 样品引起的标准不确定度 $u_r(x_3)$

3.2.3.1 样品称量引起的不确定度 $u_r(x_{3.2.3.1})$

用电子天平进行称量,藻油软胶囊试样重量 $m=0.1107\text{ g}$ ,天平的校准证书给出的测量结果示值误差的扩展不确定度 $U=0.02\text{ mg}$ , $k=2$ ,属正态分布,则有:

$$\text{标准不确定度为: } u(x_{3.2.2.2}) = \frac{U}{k} = 0.02\text{ mg}/2 = 0.00001\text{ g}$$

相对标准不确定度为: $u_r(x_{3.2.3.1})=0.00001/0.1107=0.01\%$

3.2.3.2 样品定容引起的不确定度 $u_r(x_{3.2.3.2})$

样品定容引起的不确定度与标准物质定容引起

的不确定度相同,则有:

$$u_r(x_{3.2.3.2})=u_r(x_{3.2.2.3})=0.5\%$$

由上面分析可得,藻油软胶囊样品引起的相对标准不确定度为:

$$u_r(x_3) = \sqrt{u_r^2(x_{3.2.3.1}) + u_r^2(x_{3.2.3.2})} = \sqrt{(0.01\%)^2 + (0.5\%)^2} = 0.6\%$$

3.2.4 气相色谱仪引起的不确定度 $u_r(x_4)$

仪器本身的性能因素的影响,该不确定度属 A 类评定,采用同一样品进行重复实验进行评估,其中的测量结果如下表 2。

单次测量结果的标准偏差:

$$S_2 = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = 1.1\%$$

$$\text{标准不确定度为: } u(x_{3.2.4}) = \frac{S_2}{\sqrt{n}} = 1.1\%/\sqrt{6} = 0.5\%$$

$$\text{相对标准不确定度为: } u_r(x_4) = \frac{u(x_{3.2.4})}{\bar{x}} =$$

$$0.5\%/1521.8 = 0.0004\%$$

3.2.5 合成标准不确定度评定

由表 3 中各相对不确定度合成

$$u_{cr}(x) = [u_r^2(x_1) + u_r^2(x_2) + u_r^2(x_3) + u_r^2(x_4)]^{1/2} = [(0.3\%)^2 + (0.6\%)^2 + (0.6\%)^2 + (0.0004\%)^2]^{1/2} = 0.9\%$$

各测量不确定度的统计直方图如图 2 所示

表 2 重复进样峰面积的测量值

Table 2 The repetitive determination peak area of sample ( $n=6$ )

序号	1	2	3	4	5	6	平均值
峰面积	1522.5	1520.8	1521.0	1521.2	1522.0	1523.5	1521.8

表 3 相对标准不确定度

Table 3 Relatively standard uncertainty

名称	不确定度来源	类型	相对标准不确定度值
$u_r(x_1)$	测定重复性	A	0.3%
$u_r(x_2)$	标准物质	B	0.6%
$u_r(x_3)$	样品	B	0.6%
$u_r(x_4)$	气相色谱仪	A	0.0004%

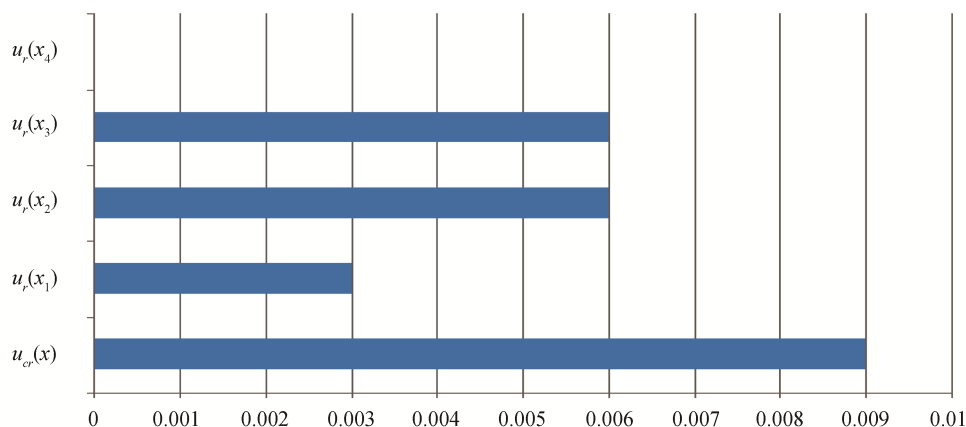


图 2 各测量不确定度的统计直方图

Fig. 2 Statistical histogram of measurement uncertainty

### 3.3 扩展不确定度评定

扩展不确定度可由合成标准不确定度乘以包含因子, 取置信概率  $p=95\%$ ,  $k=2$ , 此时藻油软胶囊样品中的 DHA 含量测定的扩展不确定度为:  $U_{95}=k \times u_{cr}(x)=2 \times 0.9\%=1.8\%$ 。

### 3.4 测量不确定度的报告与表示

藻油软胶囊样品中的 DHA 含量的测量结果为  $(28.5 \pm 28.5 \times 1.8\%)g/100g (k=2)$ , 即为  $(28.5 \pm 0.5)g/100g (k=2)$ 。

## 4 结论

本文结合检验方法和实际操作情况, 按照 GB/T 5009.168-2003 标准, 采用气相色谱法测定藻油中 DHA 含量时, 通过对各种不确定度分量的定量, 利用相对标准不确定度进行分布计算和整体合成, 为气相色谱法测量不确定度评价方法提供参考模式。

由不确定度的评定过程可知, 影响藻油中 DHA 含量测量的不确定度主要来源于标准溶液的配制、样品处理以及样品重复分析产生的不确定度。因此, 在日常检测中必须准确配置标准溶液, 注意样品的处理过程, 如称样量以及定容体积尽可能缩小以减少偏差, 还有就是在检测过程中必须保持仪器的最佳工作状态。本次的测定结果为  $(28.5 \pm 0.5)g/100g$ , 即有 95% 可能性为  $28.0 \sim 29.0 g/100g$ 。通过对不确定度的分析和评定, 对测定结果给出一个较准确的波动范围, 尤其检测结果接近规定值是, 可以降低误判风险。

## 参考文献

- [1] 陈殊贤, 郑晓辉. 微藻油和鱼油中 DHA 的特性及应用进展研究[J]. 食品科学, 2013, 21: 439-444.  
Chen SX, Zheng XH. Research on the characteristics and application of DHA in microalgae and fish oil [J]. Food Sci, 2013, 21: 439-444.
- [2] Boucher O, Burden MJ, Muckle G, *et al*. Neurophysiologic and neurobehavioral evidence of beneficial effects of prenatal omega-3 fatty acid in take on memory function at school sga [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(5): 1025-1037.
- [3] Bradbury J. Docosahexaenoic acid(DHA): an ancient nutrient for the modern human brain [J]. Nutrient, 2011, 3: 529-554.
- [4] Gusent P, Alessandri JM. Docosahexaenoic acid(DHA) and the developing central nervous system(CNS): implications for dietary recommendations [J]. Biochimie, 2011, 93(1): 7-12.
- [5] Birch EE, Carlson SE, Hoffman DR, *et al*. The diamond (DHA intake and mersurement of neural development) study: a double-masked, randomized controlled clinical trial of the maturation of infant visual acuity as a function of the dietary level of docosahexenoic acid [J]. Am J Clicial Nutr, 2010, 91(4): 848-859.
- [6] HuffmanSL, Harika RK, Eilander A, *et al*. Essentialfats: how do they affect growth and development of infan of infants and young chidren in developing coutries? Aliterature review [J]. Matwenal Child Nutr, 2011, 7(3): 44-65.
- [7] Lagmaat M, Rotteveel J, Muskiet FAJ, *et al*. Post term dietary-induced changes in DHA and AA status relate to gains in

- weight, length, and head circumference in preterm infants [J]. Prostaglandins, Leukotrienes Essential Fatty Acids, 2011, 85: 311–316.
- [8] Morit A, Bao DQ, Burke V, *et al.* Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers ambulatory blood pressure and rate in humans [J]. Hypertension, 1999, 34: 253–260.
- [9] Umemura K, Toshima Y, Asai F, *et al.* Effect of dietary docosahexaenoic acid in the rat middle cerebral artery thrombosis model [J]. Thrombosis Res, 1995, 78(5): 379–387.
- [10] Kimy J, Chung HY. Antioxidative and anti-inflammatory action of docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in epithelial cells and macrophages [J]. J Med Food, 2007, 10(2): 225–231.
- [11] Neuringer M, Connor WE, Liu DS. Biochemical and functional effects of parental and postnatal  $\omega$ -3 fatty acid deficiency on retina and brain in rhesus monkeys [J]. Proc Natl Acad Sci, 1986, 83: 4021–4023.
- [12] Morley R. Nutrition and cognition development [J]. Nutrition, 1998, 14(10): 752–754.
- [13] Clayton EH, Hanstock TL, Himeth SJ, *et al.* Reduced mania and depression in juvenile bipolar disorder associated with long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation [J]. Eur J Clin Nutr, 2009, 63(8): 1037–1040.
- [14] Timmer-bosscha H, Hossers GAP, Meijer C, *et al.* Influence of docosahexaenoic acid on cisplatin resistance in a human small cell lung carcinoma cell line [J]. Natl Cancer Inst, 1989, 81(14): 1069–1075.
- [15] Kruger MC, Coetzee M, Haag M, *et al.* Long-chain polyunsaturated fatty acid: selected mechanisms of action on bone [J]. Prog Lipid Res, 2010, 49: 438–449.
- [16] Popp-snijders C, Schouten JA, Heine RJ, *et al.* Dietary supplementation of omega-3 polyunsaturated fatty acids improves insulin sensitivity in non-insulin dependent diabetes [J]. Diabetes Res, 1987, 4(3): 141–147.
- [17] 陆明, 范国荣, 汪杨, 等. 测量不确定度在药品领域的应用 [J]. 医药导报, 2013, 32(8): 1053–1057.
- Lu M, Fan GR, Wang Y, *et al.* Application of uncertainty measurement in pharmaceutical field [J]. Her Med, 2013, 32(8): 1053–1057.

(责任编辑: 白洪健)

#### 作者简介



张喜金, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 215865748@qq.com