

气相色谱法测定鱼油软胶囊中二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的柱前衍生化方法改进

李 硕, 李 莉*, 曹 进*, 张庆生

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要: **目的** 建立柱前衍生-气相色谱法测定保健食品中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)含量的分析方法。**方法** 鱼油软胶囊经皂化后用1%的硫酸-甲醇甲酯化, 用气相色谱法测定, FID检测器检测, 色谱柱为DB-FFAP(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 进样口温度250 °C, 检测器温度260 °C, 柱温215 °C, 直接进样, 外标法定量。**结果** EPA和DHA在0.05~5 mg/mL范围内线性良好($r_{\text{EPA}}=0.9999$, $r_{\text{DHA}}=0.9999$), EPA和DHA的回收率分别为93.1%~102.3%和92.2%~103.9%, EPA和DHA的相对标准偏差均小于3%。**结论** 该方法操作简便、快捷, 避免了有毒试剂的使用, 定量准确, 重现性好, 适合大批量样品的快速检测。

关键词: 二十碳五烯酸; 二十二碳六烯酸; 柱前衍生化; 气相色谱法; 保健食品

Improvement of pre-column derivatization for the determination of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in fish oil soft capsules by gas chromatography

LI Shuo, LI Li*, CAO Jin*, ZHANG Qing-Sheng

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT: Objective To establish a rapid method for the determination of the content of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in health food by gas chromatography with pre-column derivatization. **Methods** Fish oil soft capsules were esterified with 1% sulfuric acid-methanol after saponification and then analyzed by gas chromatography coupled with flame ionization detector (FID). This method was performed by direct injection of sample via analytical column, DB-FFAP (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) under injector temperature of 250 °C, detector temperature of 260 °C, and column temperature of 215 °C. The sample was quantified by external standard method. **Results** Both EPA and DHA had a good linearity in range of 0.05~5 mg/mL ($r_{\text{EPA}}=0.9999$, $r_{\text{DHA}}=0.9999$). The recoveries of EPA and DHA were 93.1%~102.3% and 92.2%~103.9%, respectively, while the relative standard deviations of EPA and DHA were 1.85% and 1.09%, respectively. **Conclusions** This method is accurate, simple, and high-efficiency in determination of EPA and DHA simultaneously without using toxic reagents. The procedure can be easily

*通讯作者: 李莉, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: lili_nicbp@126.com

曹进, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: caojin@gmail.com

*Corresponding author: LI Li, Assistant Researcher, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: lili_nicbp@126.com

CAO Jin, Researcher, National Institutes for Food and Drug Control, No.2, Tiantanxili, Dongcheng District, Beijing 100050, China. E-mail: caojin@gmail.com

transferred to determine EPA and DHA in large number of samples.

KEY WORDS: eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; pre-column derivatization; gas chromatography; health food

1 引言

二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)均属 ω -3多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acids, PUFAs),主要富含于鱼油等海产品中。 ω -3类多不饱和脂肪酸在人体的营养、发育和健康等方面的重要生理作用,引起人们对此类不饱和脂肪酸特别是EPA和DHA的高度重视^[1-4]。近些年,市场上以EPA和DHA为功效成分的保健食品层出不穷,其中鱼油软胶囊产品占据了较大的份额。但由于原料产地、生产工艺的不同,其EPA和DHA含量存在较大的差异。

EPA和DHA常用的检测方法为气相色谱法^[5-9],因EPA和DHA属长碳链脂肪酸(12碳以上),不易气化,因此对长碳链脂肪酸的色谱分析,一般都要进行甲酯化处理。其中甲酯化反应是否迅速、完全,是EPA和DHA检测准确与否的关键。目前脂肪酸甲酯化常用的衍生化方法有两大类:碱催化法^[9-12](如氢氧化钠/氢氧化钾-甲醇溶液等)和酸催化法^[7,13,14](如硫酸/HCl-甲醇溶液、三氟化硼-甲醇溶液等)。《保健食品检验与评价技术规范》(2003年版)^[7]采用的是三氟化硼-甲醇甲酯化的方法,但该方法中加热回流的皂化方式所用装置复杂,耗时长,不利于批量样品的检测,且三氟化硼毒性大易造成环境污染。GB/T 5009.168-2003^[8]中采用的是HCl-甲醇甲酯化的方式,HCl-甲醇溶液制备较繁琐,且HCl易挥发,溶液浓度不易控制,同时方法中需多次转移、提取样品,造成样品损失,回收率偏低。GB28404-2012^[9]采用的是将试样经氢氧化钾-甲醇甲酯后,用气相色谱进行分离检测,但此方法不适用于以脂肪酸乙酯为有效成分的保健食品中EPA和DHA的测定,对于游离态的EPA和DHA也不能有效甲酯化。本研究对鱼油软胶囊类保健食品中EPA和DHA甲酯化的方法进行改进,通过不同甲酯化方法的比较,优化EPA和DHA的样品前处理条件,建立一种快速、简便的柱前衍生-气相色谱检测方法,并对20批市售鱼油软胶囊类保健食品中EPA和DHA的含量进行测定。

2 材料与方法

2.1 材料与试剂

二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸甲酯(EPA-ME)、二十二碳六烯酸甲酯(DHA-ME)标准品,纯度>99.0%(NU-CHEKPREP公司);鱼油软胶囊(市售)。

标准储备液:分别准确称取4种标准品EPA、DHA、EPA-ME、DHA-ME各0.1000g,用正己烷定容至10mL,标准储备液的质量浓度均为10mg/mL,冷冻保存。

混合标准溶液:分别取EPA、DHA及EPA-ME、DHA-ME等体积混合,配成质量浓度为5mg/mL的EPA/DHA和EPA-ME/DHA-ME混合标准溶液。

正己烷、甲醇(色谱纯, Fisher公司),其余试剂均为分析纯(国药集团)。

0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液(称取氢氧化钾28g溶于1000mL甲醇);1%硫酸-甲醇溶液(取10mL浓硫酸溶于1000mL甲醇)、三氟化硼-甲醇溶液(取47%三氟化硼乙醚溶液20mL溶于80mL甲醇)。

2.2 仪器与设备

Agilent 7890A 气相色谱仪(配FID检测器,美国安捷伦公司)。

2.3 色谱条件

色谱柱:DB-FFAP 石英毛细柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μ m);进样口温度250 $^{\circ}$ C,检测器温度260 $^{\circ}$ C,柱温215 $^{\circ}$ C;载气(氮气)流速1.0 mL/min,进样量1 μ L;分流比:30:1。

2.4 样品前处理

2.4.1 样品溶液的制备

取鱼油软胶囊20粒,将其内容物取出至50mL离心管中,漩涡振荡混匀。准确称取混匀后的样品适量于10mL容量瓶中,用正己烷溶解并定容至刻度。制成每毫升约含EPA 0.5~1.0 mg, DHA 1.0~2.0 mg的溶液,临用前制备。

2.4.2 样品皂化

移取样品溶液 2 mL 于具塞比色管中, 加入 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 2 mL, 密封, 室温漩涡振荡 5 min, 静置分层。

2.4.3 样品甲酯化

经 2.4.2 皂化后的样品溶液加入 1% 硫酸-甲醇溶液 2 mL, 密封, 漩涡振荡 5 min, 65 °C 水浴加热 1 min, 冷却至室温后加饱和氯化钠溶液 5 mL 混匀, 静置分层, 取上层溶液, 过 0.45 μm 滤膜后待测定用。

2.5 测定

分别吸取 1 μL 甲酯化后的 EPA 和 DHA 标准工作液和样品溶液, 注入气相色谱进行测定, 根据保留时间定性, 以标准工作液峰面积和浓度绘制标准曲线, 外标法定量。

3 结果与讨论

3.1 样品前处理方式的选择

目前市场上鱼油软胶囊中 EPA 和 DHA 的存在形式多种, 为了考察不同前处理方式对不同样品中 EPA 和 DHA 含量测定的影响, 本研究选取了 3 种有代表性的鱼油软胶囊样品(甲乙酯型、甘油酯型^[15]和游离型)进行测定。对样品 1(含 EPA 和 DHA 甲酯)、样品 2(含 EPA 和 DHA 甘油酯)、样品 3(含游离 EPA 和 DHA)分别经碱催化(0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇)甲酯化、酸催化(1%硫酸-甲醇)甲酯化以及按照 2.4 方法(碱皂化后用硫酸甲酯化)处理后, 用气相色谱仪进行测定, 含量测定结果见表 1。测定结果显示样品 2 含有的主要是 EPA 和 DHA 甘油酯, 单纯的酸甲酯化处理方式不能使其中的 EPA 和 DHA 转变为甲酯的形式, 对于各类脂肪酸脂而言, 通常需经碱皂化后再进

一步甲酯化^[17]; 样品 3 中的 EPA 和 DHA 是游离态, 用 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇甲酯化后测定效果欠佳, 因此对于含有游离态 EPA 和 DHA 的样品甲酯化方法不宜选用碱催化法^[15]。综合考虑鱼油软胶囊样品中 EPA 和 DHA 形态的多种可能性, 可以得出先用碱皂化再用硫酸甲酯化的样品前处理方法效果最好, 效率也最高。

此外, 本实验还将样品按照 2.4 方法处理后的测定结果与《保健食品检验与评价技术规范》(2003 版)方法^[7]测定结果做了对比, 结果见表 1。新方法用硫酸替代三氟化硼, 减少有毒试剂的使用, 同时对样品的皂化、甲酯化、分离提取均在同一比色管中, 进行, 不用加热回流, 操作快速、简便又避免了样品损失。测定结果说明硫酸-甲醇完全可以替代三氟化硼-甲醇作为 EPA 和 DHA 甲酯化的衍生试剂。

3.2 甲酯化率考察

为考察方法甲酯化是否完全, 将 EPA/DHA 混合标准溶液用正己烷配制成 0.05、0.1、0.5、1.0、5.0 mg/mL 的系列溶液, 分别取 2 mL 按 2.4.3 方法甲酯化后进行测定。然后将 EPA-ME/DHA-ME 混合标准溶液用正己烷配制成 0.05、0.1、0.5、1.0 mg/mL 的系列溶液同时进行测定。测定结果见表 2, 以 EPA/DHA 甲酯标准品的含量为目标含量, 经 2.4.3 方法衍生后的 EPA/DHA 甲酯含量为测定含量, 计算方法的甲酯化率, 可以得出甲酯化率为 98.1%~100.7%, 说明该方法甲酯化完全。考察了用 0.5 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液对 EPA/DHA 甲酯化, 研究发现 EPA/DHA 碱催化甲酯化后气相色谱测定时未能检出相应的峰, 这是因为 EPA 和 DHA 标准品为游离态脂肪酸, 碱催化法不适用于游离脂肪酸的甲酯化^[15]。

表 1 不同甲酯化方式处理后测得的样品中 EPA 和 DHA 含量
Table 1 Content of EPA and DHA in samples determined by different methyl esterification methods

	碱甲酯化		硫酸甲酯化		碱皂化后硫酸甲酯化		规范方法(三氟化硼法)	
	EPA 质量 分数(%)	DHA 质量 分数(%)	EPA 质量 分数(%)	DHA 质量 分数(%)	EPA 质量 分数(%)	DHA 质量 分数(%)	EPA 质量 分数(%)	DHA 质量 分数(%)
样品 1	16.9	13.7	20.4	15.4	20.5	15.8	20.2	15.6
样品 2	4.9	19.6	/	/	5.3	21.3	5.3	21.2
样品 3	/	/	10.5	46.3	10.8	46.7	10.7	46.6

注: “/”表示未检出。

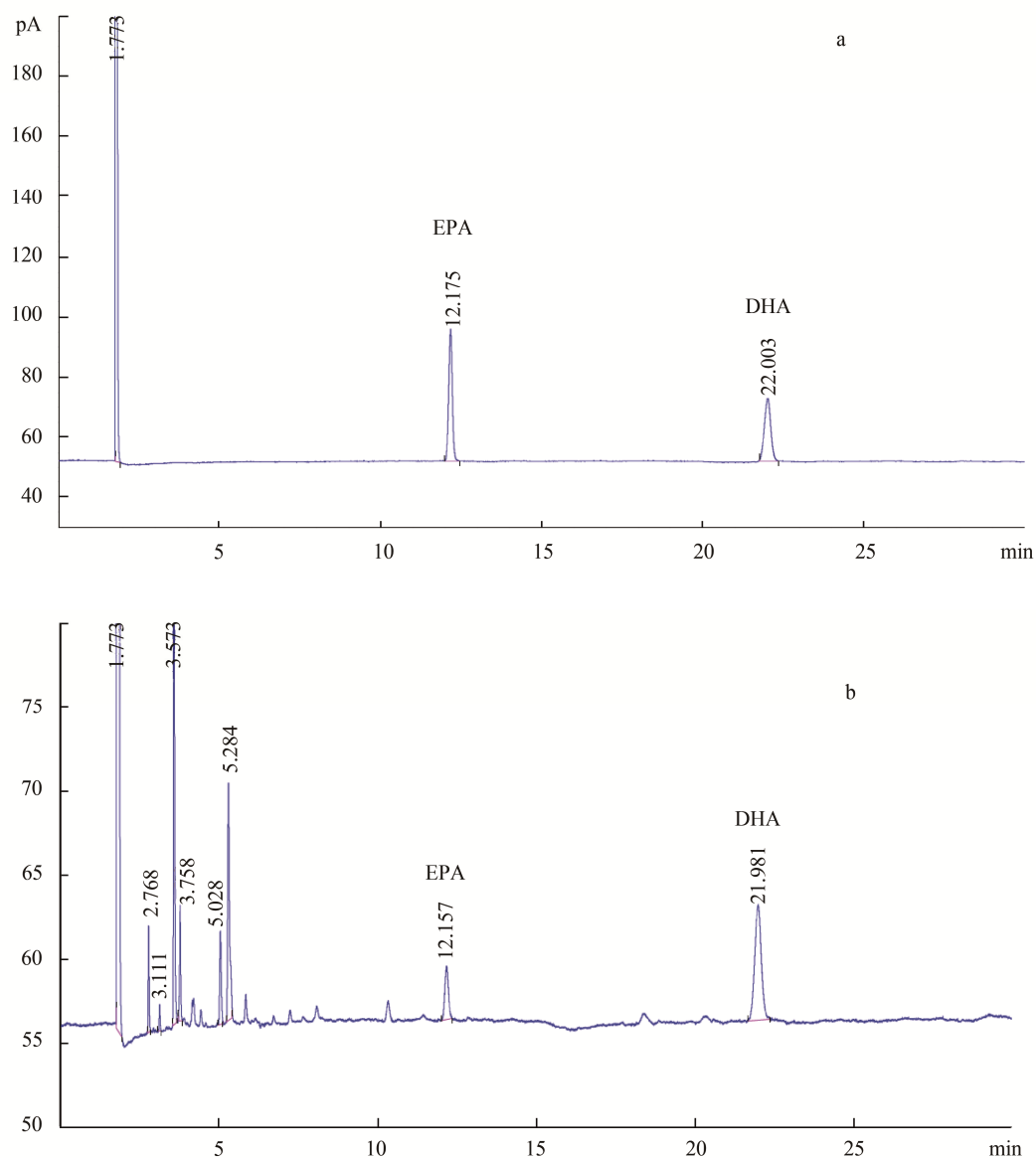


图1 标准品及样品 EPA 和 DHA 气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatograms of EPA and DHA

a: EPA/DHA 标准溶液色谱图; b: 鱼油软胶囊样品色谱图

a: Spectrum of EPA/DHA; b: Spectrum of fish oil soft capsules

表2 EPA/DHA 酸催化甲酯化率

续表2

Table 2 Sulfuric acid catalyzed esterification rate of EPA/DHA

组分	目标含量(mg)	测定含量(mg)	甲酯化率(%)
EPA	0.052	0.052	100.0
	0.104	0.102	98.1
	0.520	0.516	99.8
	1.039	1.029	99.0
	5.195	5.109	98.3

组分	目标含量(mg)	测定含量(mg)	甲酯化率(%)
DHA	0.053	0.052	98.1
	0.106	0.105	99.0
	0.532	0.536	100.7
	1.063	1.061	99.8
	5.315	5.221	98.2

3.3 线性关系

对 EPA-ME/DHA-ME 和经酸甲酯化后的 EPA/DHA 一系列标准溶液进行测定, 分别以峰面积对浓度绘制标准曲线, 均有良好的线性, EPA 甲酯回归方程: $Y=546.19X-10.549$, $r=0.9999$, DHA 甲酯回归方程: $Y=496.29X-0.9178$, $r=0.9999$, 酸催化甲酯化后的 EPA 回归方程: $Y=535.84X-6.779$, $r=0.9999$, DHA 回归方程: $Y=487.31X-1.911$, $r=0.9999$ 。

3.4 检出限

将 EPA、DHA 标准溶液分别逐级稀释, 经 2.4.3 方法衍生后进气相色谱测定, 以峰高 3 倍信噪比对应的溶液浓度为检出限, 测得 EPA 的最低检出限为 5 $\mu\text{g/mL}$, DHA 的最低检出限为 10 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.5 重复性

平行称取同一样品 6 份, 按 2.4 处理后, 气相色

谱测定。测定结果为 $RSD_{\text{EPA}}=1.85\%$, $RSD_{\text{DHA}}=1.09\%$, 重复性良好。

3.6 加样回收率

取鱼油软胶囊样品, 按 2.4 处理并测定, 作为本底; 另取等量的该样品 6 份, 添加低、中、高 3 个质量浓度的 EPA/DHA 混合标准溶液, 相同的前处理方式提取并测定, 结果见表 3。该方法的 EPA 和 DHA 的回收率分别为 93.1%~102.3% 和 92.2%~103.9%, 且相对标准偏差小于 3%, 满足实验室检测要求。

3.7 样品测定

采用 2.4 的甲酯化方法处理鱼油软胶囊样品 15 份, 测定结果见表 4。15 份样品中 EPA 或 DHA 含量均与标示值一致, 表明此方法适用于该类产品的检测。

表 3 加样回收率测定结果($n=3$)
Table 3 Results of recoveries ($n=3$)

组分	本底值(mg/g)	添加值(mg/g)	测定平均值(mg/g)	回收率(%)	RSD(%)
EPA	8.30	1.00	8.71	93.1~102.3	1.5
	8.30	10.0	17.6	94.0~99.7	2.2
	8.30	50.0	58.5	98.6~101.5	1.1
DHA	13.1	1.00	13.8	92.2~103.9	2.4
	13.1	10.0	22.4	96.5~99.8	1.2
	13.1	50.0	62.7	97.8~100.2	0.6

表 4 鱼油软胶囊中 EPA 和 DHA 含量测定结果
Table 4 The contents of EPA and DHA in fish oil soft capsules

样品编号	EPA 质量分数(%)	DHA 质量分数(%)	EPA 标示量(%)	DHA 标示量(%)
1	5.87	25.1	/	25
2	4.95	15.0	/	15
3	5.41	11.4	/	10.5
4	16.5	48.7	10~20	45~65
5	4.72	18.1	4.68	17.8
6	12.8	64.5	9~13	60~65
7	8.3	13.1	8.3	12.9
8	4.83	11.0	/	10.5
9	16.2	48.4	10~20	45~65
10	5.70	16.8	/	15
11	12.64	19.4	12	18
12	16.3	47.8	10~20	45~65
13	6.10	20.9	/	20.9
14	7.98	30.9	8	23
15	5.08	25.4	/	25

注: “/”表示产品未标识 EPA 含量。

4 结论

本研究以鱼油软胶囊保健食品为材料,对《保健食品检验与评价技术规范》测定 EPA 和 DHA 的方法进行改进,同时比较了不同甲酯化方式对 EPA 和 DHA 含量测定的影响,建立了一种测定鱼油软胶囊类保健食品中 EPA 和 DHA 的新方法。研究结果表明新方法(先经碱皂化后再用硫酸-甲醇甲酯化的衍生化)能适应鱼油软胶囊中不同形式的 EPA 和 DHA 的含量测定需求,衍生化效果好,效率高,从两种分析物甲酯与两种分析物甲酯化后分别获取的工作曲线,可以看到平行性较好,说明本方法不存在由于甲酯化过程引起的系统误差。此外,该方法用硫酸替代三氟化硼,减少有毒试剂的使用,符合绿色化学的要求,同时方法中对样品的皂化、甲酯化、分离提取均在同一比色管中进行,操作快速、简便又避免了样品损失,定量准确,重现性好,适合大批量样品的快速检测。

参考文献

- [1] Yashodhara BM, Umakanthi S, Pappachan JM, *et al.* Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease [J]. *J Perinat Med*, 2009, 85: 84-90.
- [2] Koletzko B, Uauy R, Palou A, *et al.* Dietary Intake of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in children -a workshop report [J]. *British J Nutr*, 2010, 103: 923-928.
- [3] 肖玫, 欧志强. 深海鱼油中两种脂肪酸(EPA 和 DHA)的生理功效及机理的研究进展[J]. *食品科学*, 2005, 26(8): 522-525.
Xiao M, Ou ZQ. Research progress of the physiological function and mechanism of two kinds of fatty acid (EPA and DHA) in the fish oil of deep sea [J]. *Food Sci*, 2005, 26(8): 522-525.
- [4] 朱路英, 张学成, 宋晓金, 等. n-3 多不饱和脂肪酸 DHA、EPA 研究进展[J]. *海洋科学*, 2007, 31(11): 78-85.
Zhu LY, Zhang XC, Song XJ, *et al.* Advance in n-3 polyunsaturated fatty acids DHA and EPA [J]. *Ocean Sci*, 2007, 31(11): 78-85.
- [5] Arterburn LM, Oken HA, Hall EB, *et al.* Algal-oil capsules and cooked salmon: nutritionally equivalent sources of docosahexaenoic acid [J]. *J Am Diet Assoc*, 2008, 108(7): 1204-1209.
- [6] Petrović M, Kezić N, Bolanča V, *et al.* Optimization of the GC method for routine analysis of the fatty acid profile in several food samples [J]. *Food Chem*, 2010, 122(1): 285-291.
- [7] 保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)[S].
Technical standards for testing & assessment of health food (2003 Edition) [S].
- [8] GB/T 5009.168-2003 食品中二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的测定[S].
GB/T 5009.168-2003 Determination of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in foods [S].
- [9] GB 28404-2012 食品安全国家标准 保健食品 -中亚麻酸、二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸的测定[S].
GB 28404-2012 National food safety standard-Determination of α -linolenic acid, eicosapentaenoic acid, docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in health foods [S].
- [10] 刘爱琴, 罗超杰, 孙晓霞, 等. 气相色谱法测定鱼油微胶囊中的 EPA 和 DHA 含量[J]. *中国食品添加剂*, 2011, (4): 273-276.
Liu AQ, Luo CJ, Sun XX, *et al.* Determination of the EPA and DHA in microencapsulation by gas chromatography [J]. *China Food Addit*, 2011, (4): 273-276.
- [11] 曹华娟, 曾栋, 方学新, 等. 衍生气相色谱法同时检测分析亚油酸、 α -亚油酸、 γ -亚麻酸、AA、EPA、DHA [J]. *实用预防医学*, 2006, 13(2): 295-297.
Cao HJ, Zeng D, Fang XX, *et al.* Simultaneous determination of octadecadienoic acid, alpha-octadecatrienoic acid, gamma-octadecatrienoic acid, AA EPA and DHA by derivatization gas chromatography [J]. *Prac Prev Med*, 2006, 13(2): 295-297.
- [12] 庄俊钰, 冯志强, 谢忠阳. 气相色谱内标法测定深海鱼油中的 EPA 和 DHA[J]. *现代食品科技*, 2009, 25(11): 1363-1365.
Zhuang JY, Feng ZQ, Xie ZY. Determination of EPA and DHA in deep sea fish oil by gas chromatography using internal standard method [J]. *Mod Food Sci Technol*, 2009, 25(11): 1363-1365.
- [13] 靖会, 赵惠茹, 扈本荃. 毛细管气相色谱法测定鱼油脂肪乳注射液中的 DHA 和 EPA 的含量[J]. *应用化工*, 2011, 40(3): 542-544.
Jing H, Zhao HR, Hu BQ. Determination of DHA and EPA in fish oil lipid emulsion injection by GC [J]. *Appl Chem Ind*, 2011, 40(3): 542-544.
- [14] GB/T 17376-2008/ISO5509:2000 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备[S].
GB/T 17376-2008/ISO5509:2000 Animal and vegetable fats and oils-Preparation of methyl esters of fatty acids [S].

- [15] 袁高峰, 陈小娥, 李铎. 共轭亚麻酸甲酯化方法的比较和优化 [J]. 中国粮油学报, 2011, 26(1): 70-74.

Yuan GF, Chen XE, Li D. Comparison of different methylation methods for analysis of conjugated linolenic acid [J]. J Chin Cereals Oils Assoc, 2011, 26(1): 70-74.

- [16] Okada T, Morrissey MT. Production of n-3 polyunsaturated fatty acids concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis [J]. Food Chem., 2007, 103 (4): 1411-1419.

- [17] 佘珠花. 气相色谱法中油脂脂肪酸衍生化方法及其选择[J]. 粮食加工, 2004, (6): 64-66.

She ZH. Oil fatty acid derivatization method and choose in gas chromatography [J]. Grain Proc, 2004, (6): 64-66.

(责任编辑: 杨翠娜)

作者简介



李 硕, 硕士, 主要研究方向为食品、化妆品检验及标准研究。

E-mail: pahayokolide@sina.com



李 莉, 助理研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: lili_nicbp@126.com



曹 进, 博士, 研究员, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: caojin@nifdc.org.cn