

气相色谱法测定鱼油中的二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸和二十二碳五烯酸

蔡伟江*, 张喜金, 苏昭仑

(汤臣倍健股份有限公司, 珠海 519040)

摘要: **目的** 通过优化鱼油中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)的测定条件, 建立鱼油中 EPA、DHA 和 DPA 气相色谱定量检测分析方法。**方法** 采用正己烷处理样品, 经色谱柱(Agilent, Elite-WAX, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm)分离鱼油中的 EPA、DHA、DPA 甲酯标准品, 并进行定量检测。**结果** EPA 浓度在 0.36~3.6 mg/mL、DHA 浓度在 0.37~3.7 mg/mL、DPA 浓度在 0.16~1.62 mg/mL 的范围内与峰面积的线性良好, 相关系数 $r > 0.999$ 。在 80%、100%、120%添加水平下, EPA、DHA 和 DPA 的检出限分别为 0.01%、0.03%、0.009%, EPA、DHA 和 DPA 的回收率分别为 96.2%、96.4%、95.7%。**结论** 气相色谱法灵敏度高、准确、重现性好, 适用于鱼油中 EPA、DHA 和 DPA 的含量测定。

关键词: 鱼油; 气相色谱法; 二十碳五烯酸; 二十二碳六烯酸; 二十二碳五烯酸

Determination of eicosapentaenoic acid, docosahexaenoic acid, and docosapentaenoic acid in fish oil by gas chromatography

CAI Wei-Jiang*, ZHANG Xi-Jin, SU Zhao-Lun

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

ABSTRACT: Objective To establish the method for determination of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA) in fish oil by gas chromatography quantitative analysis through optimizing the determination conditions of EPA, DHA and DPA in fish oil. **Methods** The samples were treated by hexane, EPA, DHA, and DPA in fish oil were separated with chromatographic column. Finally, the analytes were quantitatively detected. **Results** This method showed a good linearity in the range of 0.36~3.6 mg/mL for EPA, 0.37~3.7 mg/ml for DHA, and 0.16~1.62 mg/mL for DPA with the correlation coefficient $r > 0.999$, the limit of detection of EPA, DHA and DPA were 0.01%, 0.03%, 0.009% under 80%, 100%, and 120% concentrations, and recovery rate of EPA, DHA and DPA in fish oil were 96.2%, 96.4%, and 95.7%, respectively. This method is suitable for sensitive, accurate and reproducible determination of EPA, DHA and DPA in fish oil.

KEY WORDS: fish oil; gas chromatography; eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; docosapentaenoic acid

*通讯作者: 蔡伟江, 中药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。E-mail: 714524253@qq.com

*Corresponding author: CAI Wei-Jiang, Herbalists, By-Health Co., Ltd, Zhuhai 519040, China. E-mail: 714524253@qq.com

1 引言

二十碳五烯酸(EPA),是人体常用的几种 Ω -3脂肪酸之一。EPA具有降血脂、抗血小板聚集、延缓血栓形成的作用。二十二碳六烯酸(DHA),俗称脑黄金,属于 ω -3不饱和脂肪酸家族中的重要成员,DHA是神经系统细胞生长及维持的一种主要成分,是大脑和视网膜的重要构成成分,对胎婴儿智力和视力发育至关重要^[1,2]。二十二碳五烯酸(DPA)属于n-3系列不饱和脂肪酸,具有调节血脂、软化血管,降低血液粘度,改善视力、促进生长发育和提高人体免疫功能等作用。目前,含有EPA和DHA的保健品琳琅满目,品牌众多,而其测定方法主要有高效液相色谱-质谱联用法^[3],气相色谱-质谱法^[4],气相色谱法^[5-12],高效液相色谱法^[13]。在众多报道中,主要针对EPA、DHA这两种成分的检测研究,对于DPA检测报道较少。本研究主要采用气相色谱法对EPA、DHA和DPA三种成分一起检测,是一种操作比较简单、实用性较强的方法。

2 材料与方法

2.1 仪器和试剂

EPA甲酯标准品(纯度:99.0%,来源:NU-CHEK,批号:U-99M-JY23-W);DHA甲酯标准品(纯度:99.0%,来源:NU-CHEK,批号:U-84M-031-W);DPA甲酯标准品(纯度:99.0%,来源:NU-CHEK,批号:CDDE-U-101-M);甲醇(分析纯,广州化学试剂厂);正己烷(分析纯,广州化学试剂厂);氢氧化钾(分析纯,广州化学试剂厂);鱼油(挪威)。

气相色谱仪(7890A,美国安捷伦公司);色谱柱(Elite-WAX,30 m \times 0.25 mm,0.25 μ m,Agilent)。

2.2 色谱条件

色谱柱:色谱柱(Agilent, Elite-WAX, 30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m)。柱温箱温度:起始温度170 $^{\circ}$ C,保持2 min;以30 $^{\circ}$ C/min升温至200 $^{\circ}$ C,保持8 min;再以30 $^{\circ}$ C/min升温至230 $^{\circ}$ C,保持5 min;再以30 $^{\circ}$ C/min升温至240 $^{\circ}$ C,保持2.5 min。进样口温度:230 $^{\circ}$ C;进样量1 μ L,分流比10:1。FID检测器温度:260 $^{\circ}$ C。载气:高纯氮气,流量1.0 mL/min,尾吹30 mL/min。氢气:30 mL/min;

空气400 mL/min。

2.3 标准品溶液的配制

精确称取EPA甲酯对照品180.60 mg、DHA甲酯对照品186.10 mg、DPA甲酯对照品82.00 mg于10 mL容量瓶中,加入100%正己烷溶解并定容至刻度,摇匀。精密吸取0.2、0.5、1.0、1.5、2.0 mL于10 mL容量瓶中,配成EPA浓度为0.357588、0.89397、1.78794、2.68191、3.57588 mg/mL的标准溶液,DHA浓度为0.368478、0.921195、1.84239、2.763585、3.68478 mg/mL的标准溶液,DPA浓度为0.16236、0.4059、0.8118、1.2177、1.6236 mg/mL的标准溶液。

2.4 供试品溶液的配制

称取混合均匀的样品50 mg至25 mL比色管中,加入10 mL100%正己烷轻轻溶解,摇匀。加入7.0 mL氢氧化钾甲醇溶液,振荡混合5 min,静置5 min,加入6 mL蒸馏水,上下振摇0.5 min,静置分层后,吸取下层液体,弃去后再反复用少量蒸馏水进行洗涤,并用吸管弃去水层,直至洗至中性(若有机相有乳化现象,以4000 r/min离心10 min),吸取正己烷层待上机测试用。

2.5 线性实验

将EPA、DHA、DPA标准溶液,经0.45 μ m的微孔滤膜过滤,进行气相色谱分析,记录色谱图,以标准品浓度为(X)横坐标,标准品的峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,求得回归方程。

2.6 精密性实验

精密称取样品6份,按2.4供试品制备方法处理样品,检测样品含量,计算其相对标准偏差RSD(%)。

2.7 加标回收实验

精密称取约50 mg样品9份,置于10 mL容量中,分成3组,每组3份,于每一组中分别精密加入EPA甲酯标准使用液(浓度为2.68191 mg/mL)、DHA甲酯标准使用液(浓度为2.763585 mg/mL)、DPA甲酯标准使用液(浓度为0.8118 mg/mL)各3个80%、100%、120%不同梯度的量,按2.4供试品制备方法处理样品,经0.45 μ m的微孔滤膜过滤,即为加标溶液。

3 结果与讨论

3.1 标准曲线确证结果

EPA、DHA、DPA 的标准曲线方程见表 1。3 个成分的相关系数都在 0.999 以上, EPA 浓度在 0.36~3.6 mg/mL、DHA 浓度在 0.37~3.7 mg/mL、DPA 浓度在 0.16~1.62 mg/mL 的范围内均具有良好的线性。

表 1 标准曲线方程的结果
Table 1 The results of standard curve equation

名称	标准曲线方程	相关系数(<i>r</i>)
EPA	$Y_1=1046.9X_1+41.672$	0.9997
DHA	$Y_2=1013.8X_2+40.483$	1.0000
DPA	$Y_3=1053.3X_3+21.148$	1.0000

3.2 检出限和定量限

分析方法的检出限 LOD 和定量限 LOQ 由信噪比(*S/N*)计算。LOD 定义为 *S/N*=3 时对应的待分析浓度, LOQ 定义为 *S/N*=10 时对应的待分析浓度。

3.2.1 检出限

(1) EPA 将浓度为 LOD=0.00055 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件计算得 *S/N*=3。按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: $0.00055 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} / 50 \text{ mg} \times 0.9557 \times 100 = 0.01\%$

(2) DHA 将浓度为 LOD=0.0016 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件的计算得 *S/N*=3。按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: 0.0016

mg/mL $\times 10 \text{ mL} / 50 \text{ mg} \times 100 \times 0.9590 = 0.03\%$

(3) DPA 将浓度为 LOD=0.00045 mg/mL 的对照溶液进样, 通过工作软件的计算得 *S/N*=3。按实际样品的处理过程计算, 方法的检出限为: $0.00045 \text{ mg/mL} \times 10 \text{ mL} / 50 \text{ mg} \times 100 \times 0.9592 = 0.009\%$

3.2.2 定量限

(1) EPA 以 *S/N*=10 定方法的检测浓度为: LOQ = LOD/3 $\times 10$, 按照实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为: $0.01/3 \times 10 = 0.03\%$ 。

(2) DHA 以 *S/N*=10 定方法的检测浓度为: LOQ = LOD/3 $\times 10$, 按照实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为: $0.03/3 \times 10 = 0.1\%$ 。

(3) DPA 以 *S/N*=10 定方法的检测浓度为: LOQ = LOD/3 $\times 10$, 按照实际样品的处理过程计算, 方法的定量限为: $0.009/3 \times 10 = 0.03\%$ 。

3.3 精密度实验

EPA、DHA、DPA 的精密度结果见表 2, 6 个样品的相对标准偏差(RSD)均小于 1.0%, 表明该方法有良好的精密度。

3.4 回收率实验

EPA、DHA、DPA 在 3 个不同添加水平下浓度的回收率结果见表 3, 3 个浓度下样品中的 EPA、DHA、DPA 的提取平均回收率分别为: 96.2%、96.4%、95.7%, 相对标准偏差(RSD)均小于 2.5%。

3.5 实际样品的测定

在 2.2 条件下, 与 EPA、DHA、DPA 甲酯标准品色谱峰相对应的位置上, 可以分离鱼油中的 EPA、DHA、DPA 甲酯, 保留时间分别是 13.441、17.728、17.216 min, 如图 1 所示, 分离效果良好, 同时也不会受杂质峰的影响。

表 2 精密度的实验结果 (*n*=2)
Table 2 The precision of the experimental results (*n*=2)

名称	含量(%)	平均含量(%)	RSD(%)
EPA	15.19; 15.11; 15.18; 15.35; 15.28; 15.24	15.2	0.6
DHA	10.50; 10.42; 10.50; 10.51; 10.51; 10.49	10.5	0.4
DPA	1.67; 1.69; 1.68; 1.68; 1.67; 1.68	1.7	0.5

表 3 加标回收率实验结果 ($n=3$)
Table 3 Standard addition recovery experiment results ($n=3$)

名称	理论加标量(mg)	实际测得标准品量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
EPA	6.436584	6.187267	96.13	96.2	0.2
	8.045730	7.728333	96.06		
	9.654876	9.303467	96.36		
DHA	4.974453	4.696810	94.42	96.4	2.2
	6.079887	5.847517	96.18		
	7.185321	7.080682	98.54		
DPA	1.29888	1.24203	95.62	95.7	0.2
	1.62360	1.55322	95.67		
	1.94832	1.86806	95.88		

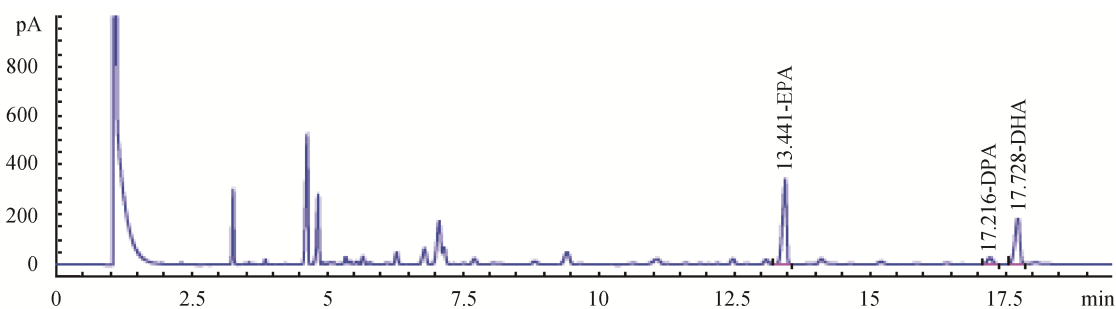


图 1 样品的色谱峰图

Fig. 1 Chromatogram of sample

4 结论

本文通过正己烷对样品进行溶解, 经色谱柱 (Agilent, Elite-WAX, 30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 可以分离鱼油中的 EPA、DHA、DPA 甲酯标准品, 并进行定量检测。通过测定其线性范围、检出限、定量限、精密度和回收率实验, 结果令人满意。表明该方法适用于测定含鱼油类保健品中 EPA、DHA、DPA 的含量检测。

参考文献

- [1] 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): 522-526.
Xiao M, Ou ZQ. Research progress of the physiological function and mechanism of two kinds fo fatty acid (EPA and DHA) in the fish oil of deep sea [J]. Food Sci, 2005, 26(8): 522-526.
- [2] 丁兆坤, 张海柱, 许友卿. 二十二碳六烯酸和二十碳五烯酸研究的综述[J]. 中国科技论文在线, 2007, 2(2): 107-116.
Ding ZK, Zhang HZ, Xu YQ. A review of studies on docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids [J]. Sciencepaper Online, 2007, 2(2): 107-116.
- [3] 全文琴, 陈小娥, 陈洁, 等. 高效液相色谱-质谱联用直接测定鱼油中 EPA/DHA 含量[J]. 食品与机械, 2008, 24(2): 114-117 .
Quan WQ, Chen XE, Chen J, *et al.* Direct determination of EPA/DHA content in fish oil by high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Food Mach, 2008, 24(2): 114-117 .
- [4] 牟峻, 曲忠文. 鱼油制品中 EPA/DHA 检测方法的研究[J]. 食品科学, 2001, 22(10): 76-78.
Mou J, Qu ZW. Study on the detection method of EPA/DHA in

- fish oil and its products [J]. Food Sci, 2001, 22(10): 76–78.
- [5] 张秋会, 柳艳霞, 赵改名, 等. 8种海洋微藻中EPA和DHA含量的测定[J]. 食品与机械, 2006, 22(6): 113–114.
- Zhang QH, Liu YX, Zhao GM, *et al.* Determination of 8 species of marine microalgae and the content of DHA in EPA [J]. Food Mach, 2006, 22(6): 113–114.
- [6] 燕福生, 李鸿筠. 鳀鱼鱼油中EPA和DHA的气相色谱分析[J]. 首都医学院学报, 1994, 1: 21–25.
- Yan FS, Li HJ. Analysis of EPA and DHA in the anchovy oil by gas chromatography [J]. J Cap Univ Med Sci, 1994, 1: 21–25.
- [7] 沈崇钰, 杨慧萍. 深海鱼油中EPA、DHA的快速测定方法[J]. 食品科技, 2000, 6: 56–57.
- Shen CY, Yang HP. Rapid method for determination of EPA, DHA in deep sea fish oil [J]. Food Sci Technol, 2000, 6: 56–57.
- [8] 刘波, 郎昭斌. 气相色谱法测定奶粉中的EPA和DHA[J]. 中国乳品工业, 1997, 3: 45–47.
- Liu B, Lang ZB. Milk powder by gas chromatography in EPA and DHA [J]. China Dairy Ind, 1997, 3: 45–47.
- [9] 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.
- Zhang JY, Feng ZQ, Xie ZY. Determination of EPA and DHA in deep sea fish oil by gas chromatography internal standard method [J]. Mod Food Sci Technol, 2009, 25(11): 1363–1365.
- [10] 李庆民, 陈桂范. 气相色谱外标法测定鱼油中EPA和DHA的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 1996, 4: 259–261.
- Li QM, Chen GF. Determination of the content of EPA and DHA in fish oil by gas chromatography with external standard method [J]. J Shenyang Pharm Univ, 1996, 4: 259–261.
- [11] 刘爱琴, 罗超杰, 孙晓霞, 等. 气相色谱法测定鱼油微胶囊中EPA和DHA的含量[J]. 中国食品添加剂, 2010, 4: 273–276.
- Liu AQ, Luo CJ, Sun XX, *et al.* Gas chromatographic method for determining the content of EPA and DHA in fish oil micro capsule [J]. China Food Addit, 2010, 4: 273–276.
- [12] 伍良涌, 廖泰星. GC法测定深海鱼油软胶囊中EPA和DHA的含量[J]. 中国药品标准, 2011, 5: 357–360.
- Wu LY, Liao TX. Determination of the content of EPA and DHA in deep sea fish oil soft capsule by GC [J]. Chin Drug Stand, 2011, 5: 357–360.
- [13] 郭爱民, 燕福生. 高效液相色谱法分离测定鱼油中的EPA和DHA[J]. 首都医学院学报, 1995, 4: 263–267.
- Guo AM, Yan FS. Separation and determination of EPA and DHA in fish oil by high performance liquid chromatography [J]. J Cap Univ Med Sci, 1995, 4: 263–267.

(责任编辑: 李振飞)

作者简介



蔡伟江, 中药师, 主要研究方向为保健食品的质量检测。

E-mail: 714524253@qq.com