

# 气相色谱法多重检验海豹油中二十碳五烯酸、二十二碳五烯酸和二十二碳六烯酸方法研究

胡焯敏<sup>1</sup>, 刘笑笑<sup>1</sup>, 林志鹏<sup>1</sup>, 陈金显<sup>2\*</sup>, 焦红<sup>3\*</sup>

(1. 广州市宜健医学技术发展有限公司, 广州 510663; 2. 广州普正生物科技有限公司, 广州 510663;  
3. 广东出入境检验检疫局, 广州 510623)

**摘要:** **目的** 建立多重检验海豹油中二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、二十二碳五烯酸(docosapentaenoic acid, DPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)的气相色谱法。**方法** 用氢氧化钾甲醇溶液将样品中 EPA、DPA 和 DHA 甲酯化, 气相色谱程序升温同时分析 3 个  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸, 分别用外标法和内标法进行定量。**结果** 3 个  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的外标法定量线性范围为 50~5000  $\mu\text{g/mL}$ , 相关系数均 > 0.999, 精密度相对标准偏差均 < 10%, 回收率均 > 90%; 内标法定量的精密度相对标准偏差均 < 10%, 回收率均 > 85%; 外标法和内标法对 3 个  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的结果比较, CV%均小于 10%。**结论** 该方法操作简单快捷, 适用于进口海豹油中 EPA、DPA 和 DHA 的含量简便和准确的测定。

**关键词:** 二十碳五烯酸; 二十二碳五烯酸; 二十二碳六烯酸; 外标法; 内标法

## Analytical methods of eicosapentaenoic acid, docosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid in seal oil by gas chromatography

HU Ye-Min<sup>1</sup>, LIU Xiao-Xiao<sup>1</sup>, LIN Zhi-Peng<sup>1</sup>, CHEN Jin-Xian<sup>2\*</sup>, JIAO Hong<sup>3\*</sup>

(1. Guangzhou Yi-Jian Biomedical Technology Development Co., Ltd., Guangzhou 510663, China; 2. Procept Biotech Co., Ltd., Guangzhou 510663, China; 3. Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Guangzhou 510623, China)

**ABSTRACT: Objective** To establish a method for the determination of eicosapentaenoic acid (EPA), docosapentaenoic acid (DPA), and docosahexaenoic acid (DHA) in seal oil by gas chromatography. **Methods** The EPA, DPA, DHA in the samples were methylated with KOH-CH<sub>3</sub>OH solution. Three kinds of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids were analyzed simultaneously by using temperature rising program of gas chromatograph, and quantified by the external standard method and internal standard method. **Results** The linear range of the external standard of 3 kinds of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids were 50~5000  $\mu\text{g/mL}$ , the correlation coefficients were all over 0.999, the relative standard deviations (RSDs) of precision were less than 10%, and the recovery rates were all over 90%. RSDs of precision of internal standard method were lower than 10% and the recovery rates were all over 85%. The CV% of external standard method and internal standard method for the 3 kinds of  $\omega$ -3 polyunsaturated fatty acids were less than 10%. **Conclusion** This method is

\*通讯作者: 陈金显, 博士, 主要研究方向为食品科学与加工。E-mail: juliankc@pb95.com

焦红, 研究员, 主要研究方向为食品安全与营养学分析技术。E-mail: jhciq1228@163.com

\*Corresponding author: CHEN Jin-Xian, Doctor, Procept Biotech Co., Ltd., Guangzhou High and New Technology Industrial Development Zone Xiangshan Road 17, Guangzhou 510663, China. E-mail: juliankc@pb95.com

JIAO Hong, Professor, Guangdong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.66, Zhujiang New City Huacheng Avenue, Guangzhou 510623, China. E-mail: juliankc@pb95.com

simple and rapid, and can be used to determine the contents of DHA, DPA and EPA in imported seal oil easily and accurately.

**KEY WORDS:** eicosapentaenoic acid; docosapentenoic acid; docosahexaenoic acid; external standard method; internal standard method

## 1 引言

海豹油是从海豹脂肪组织中提取的油脂,富含人体所必需的 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸,含量高达20%~25%。海豹油中 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸主要由被誉为“血管清道夫”的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)、“脑黄金”的二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)和二十二碳五烯酸(docosapentenoic acid, DPA)组成,能有效调节血脂,降低胆固醇和甘油三酯,防止血栓形成与中风,防止心脑血管疾病,增强智力和记忆力,延缓脑衰老,防止老年性痴呆,改善视力以及视疲劳和提高人体免疫力<sup>[1-10]</sup>。同时,其在某些肿瘤的防治如女性乳腺癌<sup>[11,12]</sup>、直肠癌<sup>[7]</sup>等都有显著作用。其对炎症反应疾病<sup>[13,14]</sup>也有很好的调节作用。特别值得一提的是,海豹油中富含的DPA是人类母乳的重要免疫因子,是鱼油及其他食品所缺乏的<sup>[7]</sup>。因此,海豹油被专家认为是当今社会的高级保健品。

海豹油中含有大约20%~25%的 $\omega$ -3不饱和脂肪酸,其中DPA约占5%~6%。海豹油区别于其他鱼油的优势性特点之一是,鱼油中几乎不含DPA。因为鱼油中不含DPA,目前国际国内特定鱼油中 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的标准检验方法中,只有EPA和DHA是一起检验的,而DPA是单独用另一种方法检验的。我国食品安全卫生管理部门在执行鱼油、海豹油功效成分质量把关时,也是采用SN/T 2922-2011《出口食品中EPA和DHA的测定气相色谱法》<sup>[15]</sup>测定EPA和DHA,用GB/T 22223-2008《食品中总脂肪、饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸的测定》<sup>[16]</sup>来测定DPA。

为了提高检验效率,降低检验成本,为生产企业和监管部门提供准确和简便的检验技术服务,本研究用海豹油作为研究对象,用国家标准检验方法GB/T 22223-2008和SN/T 2922-2011作为参比检验方法,建立海豹油中EPA、DHA和DPA同时多重检验的方法,分内标法和外标法。

由于国标方法是针对保健食品建立的,保健食

品中的 $\omega$ -3不饱和脂肪酸多为人工添加,而海豹油是唯一一种同时含EPA、DHA和DPA的纯动物油脂,所以本研究在样品前处理和仪器条件方面都有别于国标方法。同时,本研究通过实验室内验证优化方法的各项性能,保证方法的准确性;对同一个样品,通过与标准方法检验结果的比对和多个实验室间的结果比对,确定方法的稳定性和适用性。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器

气相色谱仪,配氢火焰离子化检测器(FID)(GC-2014C 日本); Wonda CAP WAX(0.25 mm×30 m, 0.25  $\mu$ m)(日本岛津公司);天平(感量为0.1mg)(上海越平科学仪器有限公司);涡旋振荡器(上海沪西分析仪器有限公司);离心机(湖南恒诺仪器设备有限公司)。

### 2.2 试剂

二十碳五烯酸(EPA)甲酯(纯度>99%,美国NU-CHEK),二十二碳六烯酸(DHA)甲酯(纯度>99%,美国NU-CHEK),二十二碳五烯酸(DPA)甲酯(纯度>99%,美国NU-CHEK);内标物质:二十三烷酸(C<sub>23:0</sub>)甲酯(纯度>99%,美国NU-CHEK);正己烷(色谱纯,CNW);甲醇(色谱纯,CNW);氢氧化钾、氯化钠(分析纯,广州化学试剂厂)。

### 2.3 标准储备液的配制

分别称取0.0800 g DPA甲酯、DHA甲酯和EPA甲酯标准品于10 mL容量瓶中,分别用正己烷溶解并定容至刻度,摇匀。此溶液应贮存于-20℃冰箱中。临用前用正己烷将标准储备液混合并稀释为标准使用系列。内标C<sub>23:0</sub>甲酯溶液:称取0.0200 g二十三烷酸甲酯标准品于10 mL容量瓶中,用正己烷溶解并定容至刻度,摇匀。此溶液应贮存于-20℃冰箱中。

### 2.4 色谱条件

色谱柱为Wonda CAP WAX(0.25 mm×30 m, 0.25

$\mu\text{m}$ ); 升温程序: 起始温度 180  $^{\circ}\text{C}$ , 以 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 220  $^{\circ}\text{C}$ , 然后以 6  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 240  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 15 min; 进样口温度: 250  $^{\circ}\text{C}$ ; 进样量: 1  $\mu\text{L}$ ; 分流比: 1:20; 检测器温度: 270  $^{\circ}\text{C}$ ; 载气: 高纯氮气; 柱流量: 0.8 mL/L; 尾吹 30 mL/min; 氢气: 30 mL/min; 空气: 400 mL/min。

## 2.5 样品前处理

### 2.5.1 外标法

取 0.2500 g 海豹油(由广州普正生物科技有限公司提供)于 25 mL 比色管中, 先往比色管中加入约 5 mL 正己烷, 于涡旋振荡器上振荡使样品充分溶解, 用正己烷定容至刻度, 混匀; 吸取 2 mL 样液于 10 mL 具塞玻璃管中, 加入 2 mL 0.5 mol/L 的 KOH-甲醇溶液, 用漩涡振荡器充分振荡 5 min, 静置 5 min, 加入 6 mL 饱和氯化钠溶液, 手摇 10 s, 以 2000 r/min 转速离心 5 min, 吸取上层正己烷层, 定容, 待上机测定。

### 2.5.2 内标法

取 0.2500 g 海豹油于 25 mL 比色管中, 先往比色管中加入约 5 mL 正己烷, 于涡旋振荡器上振荡使样品充分溶解, 用正己烷定容至刻度, 吸取 2 mL 于 10 mL 具塞玻璃管中, 准确加入 0.5 mL 内标溶液  $\text{C}_{23:0}$  甲酯, 加入 2 mL 0.5 mol/L 的 KOH-甲醇溶液, 用漩涡振荡器充分振荡 5 min, 静置 5 min, 加入 6 mL 饱和氯化钠溶液, 手摇 10 s, 以 2000 r/min 转速离心 5 min, 吸取上层正己烷层, 定容, 待上机测定。

## 2.6 结果计算

### 2.6.1 外标法

根据样品色谱峰面积查标准曲线得各  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸甲酯的含量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 按公式(1)计算样品中各  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的含量:

$$X = \frac{C \times V \times F}{M \times 1000 \times 1000} \times 100 \quad (1)$$

式中:  $X$ -样品中 EPA、DHA、DHA 的含量( $\text{g}/100\text{g}$ );  $C$ -在标准曲线中查得的各脂肪酸甲酯的浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $V$ -测定样液最终定容体积( $\text{mL}$ );  $M$ -称样量( $\text{g}$ );  $F$ -为各脂肪酸甲酯转化成脂肪酸的换算系数, EPA 甲酯的转化系数为 0.9619, DPA 甲酯为 0.9592, DHA 甲酯为 0.9632; 100, 1000 为单位换算系数。

### 2.6.2 内标法

根据标准品色谱图中各  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸甲

酯的峰高和浓度, 按公式(2)计算校正因子。

$$f = \frac{A_s \times M_r}{M_s \times A_r} \quad (2)$$

式中:  $f$ -为校正因子;  $A_s$ -二十三烷酸甲酯的峰高;  $A_r$ -混合标准溶液中各目标物的峰高;  $M_s$ -二十三烷酸甲酯的浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ );  $M_r$ -混合标准溶液中各待测物的浓度( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )。

校正因子测定完毕后, 用相同的仪器条件同时进行样品液测定, 以保留时间定性, 测得的各  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸甲酯峰高结合平均校正因子进行定量( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 按公式计算样品中各  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸的含量:

$$X = \frac{f \times A_i \times W_s \times F}{A_s \times W} \times 100 \quad (3)$$

式中:  $X$ -样品中 EPA、DHA、DHA 的含量( $\text{g}/100\text{g}$ );  $f$ -校正因子;  $A_i$ -样品中各待测物的峰高;  $A_s$ -样品中内标物的峰高;  $W_s$ -为内标二十三烷酸甲酯的质量( $\text{g}$ );  $W$ -为最终测定样液所代表的试样量( $\text{g}$ );  $F$ -各脂肪酸甲酯转化成脂肪酸的换算系数, EPA 甲酯的转化系数为 0.9619, DPA 甲酯为 0.9592, DHA 甲酯为 0.9632; 100 为单位转换。

## 3 结果与讨论

### 3.1 色谱条件优化

#### 3.1.1 色谱柱的选择

对比毛细管色谱柱 Wonda CAP WAX(0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ )和 CD-2560(0.25 mm $\times$ 100 m, 0.2  $\mu\text{m}$ )对 EPA 甲酯、DHA 甲酯、DPA 甲酯和内标物质(二十三烷酸甲酯)的分离效果。在最佳仪器条件下, 两种色谱柱均能分离开 EPA 甲酯、DHA 甲酯、DPA 甲酯和内标物质, 但是 CD-2560 所需要的分析时间比 Wonda CAP WAX 多一半。所以在满足海豹油中 3 种  $\omega$ -3 多不饱和脂肪酸甲酯定量分析要求的前提下, 从更经济快速角度考虑, 本研究选用了 Wonda CAP WAX(0.25 mm $\times$ 30 m, 0.25  $\mu\text{m}$ )为分离柱。

#### 3.1.2 升温程序的选择

对比以下 4 种不同的升温程序对 EPA、DPA、DHA 和内标物二十三烷酸甲酯的分离效果, 结果见图 1。

(1)起始温度 180  $^{\circ}\text{C}$ , 以 8  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 220  $^{\circ}\text{C}$ , 然后以 2  $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  的速率升至 240  $^{\circ}\text{C}$ , 保持 15min。

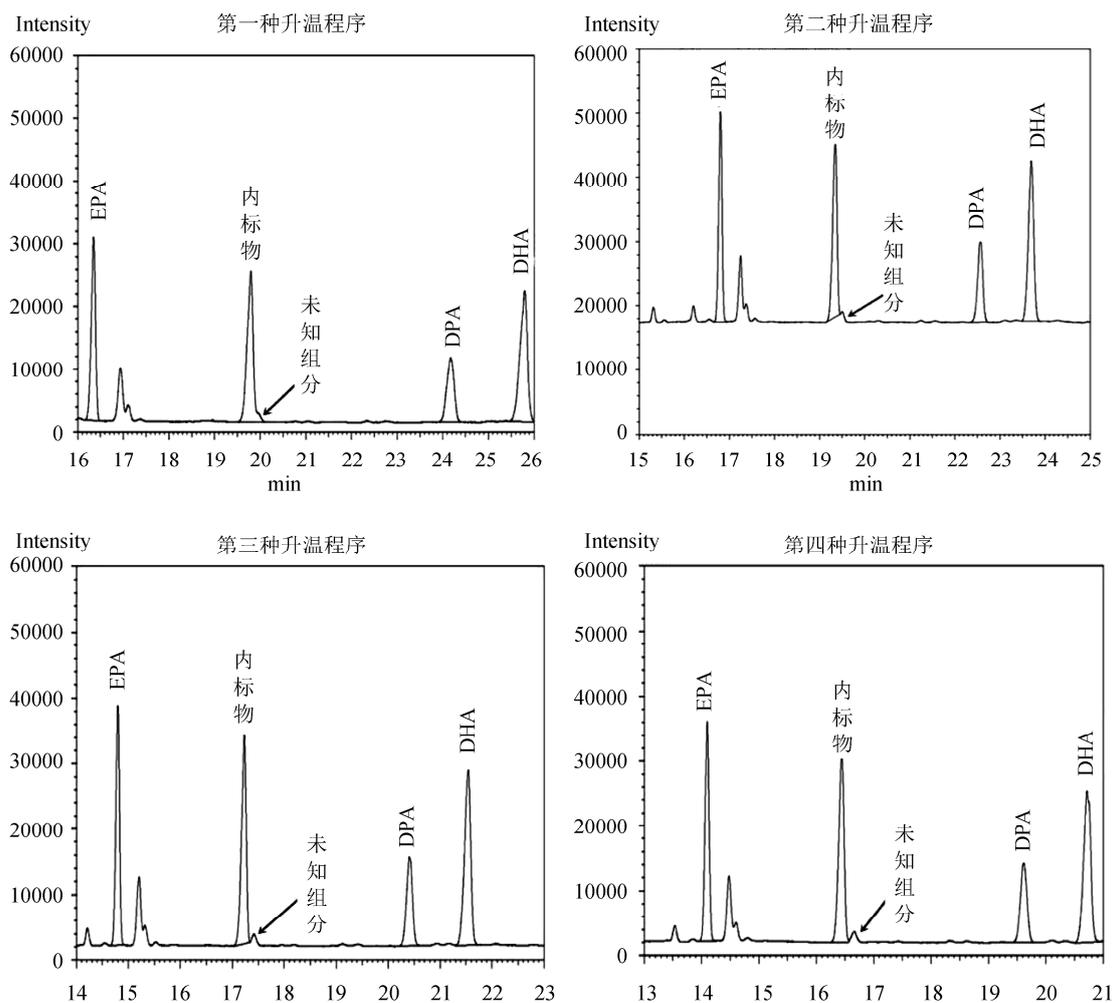


图1 升温程序优化色谱图

Fig. 1 Temperature program optimization of chromatogram

(2)起始温度 180 °C, 以 8 °C/min 的速率升至 220 °C, 然后以 3 °C/min 的速率升至 240 °C, 保持 15min。

(3)起始温度 180 °C, 以 5 °C/min 的速率升至 220 °C, 然后以 3 °C/min 的速率升至 240 °C, 保持 15min。

(4)起始温度 180 °C, 以 8 °C/min 的速率升至 220 °C, 然后以 6 °C/min 的速率升至 240 °C, 保持 15min。

由分离图谱可知, EPA、DPA 和 DHA 三者的分离效果和峰形在不同的升温程序中都较理想, 内标物与样品中的某种脂肪酸的分离则较难处理, 前 3 种程序都没有对其进行有效分离, 但随着第一段和

第二段升温速率的增加, 分离效果有好转的迹象, 因此在同时加大了第一段和第二段升温速率后, 两者得到了有效的分离, 因此, 本研究采用第 4 种升温程序(柱初温为 180 °C, 以 8 °C/min 升温至 220 °C, 再以 6 °C/min 升温至 240 °C, 保持 15 min)作为最终的实验条件。

### 3.2 甲酯化条件的优化

#### 3.2.1 甲酯化试剂浓度的选择

甲酯化试剂浓度是影响甲酯化程度的一个重要因素, 若甲酯化不完全则会影响实验结果的准确性。本实验对使用不同浓度甲酯化试剂的实验结果进行了对比, 结果如图 2。

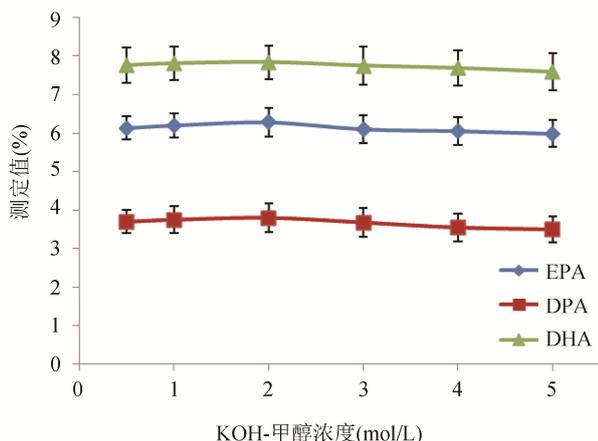


图 2 KOH-甲醇浓度对于测定结果的影响

Fig. 2 Effect of KOH-CH<sub>3</sub>OH solution concentration on determination results

由图 2 可知, KOH 浓度在 0.5~2 mol/L 之间的变化不大, 当大于 2 mol/L 时, 测定结果有所下降, 从经济适用的角度考虑, 最终选择 0.5 mol/L 作为试验浓度。

### 3.2.2 甲酯化试剂体积的选择

当浓度一定时, 甲酯化试剂的加入量又显得极为重要, 既要确保甲酯化程度的完全也不能造成浪费。本实验对比了不同加入量的 KOH-甲醇溶液对实验结果的影响, 结果如图 3。

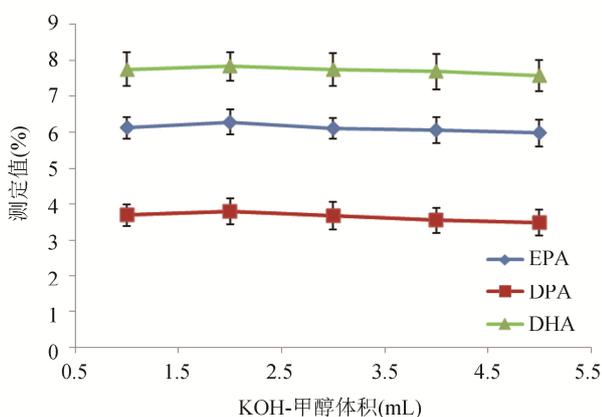


图 3 KOH-甲醇体积对于测定结果的影响

Fig. 3 Effect of KOH-CH<sub>3</sub>OH solution volume on determination results

由图 3 可知, 当 KOH-甲醇的加入量为 2 mL 时, 各种物质的测定值达到峰值, 且随加入量的增加, 对结果影响不大, 因此, 最终选择 2 mL 作为最后的实验体积。

### 3.2.3 甲酯化时间的选择

时间是影响甲酯化程度的又一重要因素, 合适的甲酯化时间即可以保证实验结果的准确性也能确保实验的效率。本实验对比了不同甲酯化时间对实验结果的影响, 结果如图 4。

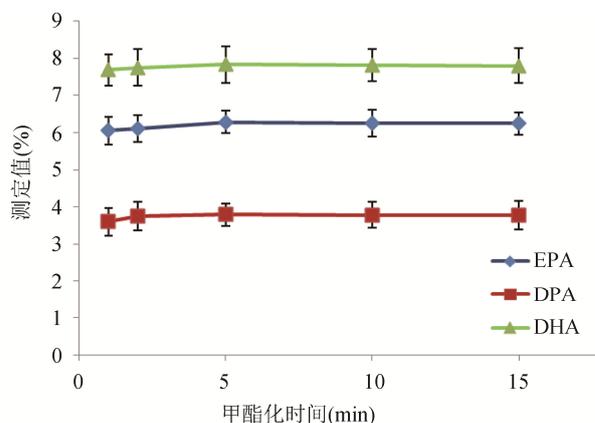


图 4 甲酯化反应时间对于测定结果的影响

Fig. 4 Effect of reaction time of methyl esterification on determination results

由图 4 可知, 当甲酯化时间从 1 min 增加到 5 min 时, 测定结果逐渐增大, 当反应时间大于 5 min 时, 测定结果趋于稳定, 因此本实验选择甲酯化时间为 5 min。

### 3.3 外标法定量——标准曲线及最低检测限

配制一系列的 DPA、DHA 和 EPA 甲酯标准溶液, 浓度范围在 50~5000  $\mu\text{g/mL}$ , 进样 1.0  $\mu\text{L}$ , 以保留时间定性, 以峰面积为横坐标( $X$ ), 浓度为纵坐标( $Y$ )绘制标准曲线。最低检测限  $C_{\min}=3 SD/B$ , 最低定量限  $C_{\min}=10 SD/B$ ,  $SD$  为标准偏差,  $B$  为标准曲线的斜率。DPA、DHA 和 EPA 甲酯测定的线性方程、相关系数、检出限、定量限及线性范围见表 1。

GB/T 22223-2008<sup>[16]</sup>和 SN/T 2922-2011<sup>[15]</sup>国家标准中, 规定的各种脂肪酸的检出限为 0.1 g/100 g, 而本方法的检出限 EPA 为 0.087 g/100 g, DPA 为 0.132 g/100 g, DHA 为 0.152 g/100 g, 检出限与相关的国家标准相当, 满足测试要求。

### 3.4 内标法定量——校正因子

取二十三烷酸甲酯溶液 500  $\mu\text{L}$ , EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯标准脂肪酸甲酯溶液各 100  $\mu\text{L}$ , 正己烷 200  $\mu\text{L}$  配成标准混合溶液, 进样 1  $\mu\text{L}$ , 测得各组

分相对应的峰高, 计算 EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯对应  $C_{23:0}$  甲酯的相对校正因子, 结果见表 2。

### 3.5 方法精密度

#### 3.5.1 外标法

取同一个海豹油样品 6 份, 按 2.5.1 所述步骤进行样品处理, 2.6.1 所述步骤进行样品定量分析, 得到 DPA、DHA 和 EPA 甲酯测定的精密度, 结果见表 3。

由表 3 可知, 6 次样品测试, 3 个指标的相对标准偏差均 < 5%, 说明本外标法所测结果具有很好的重

现性。

#### 3.5.2 内标法

取同一个海豹油样品 6 份, 按 2.5.2 所述步骤进行样品处理, 2.6.2 所述步骤进行样品定量分析, 得到 DPA、DHA 和 EPA 甲酯测定的精密度, 结果见表 4。

由表 4 可知, 对同一个海豹油样品进行内标法重复测定 6 次, EPA、DPA 和 DHA 的 CV% 都小于 10%, 说明本方法的内标法所测结果具有很好的重现性。

表 1 EPA、DPA、DHA 甲酯测定的线性方程、相关系数、检出限、定量限及线性范围  
Table 1 Linear equations, correlation coefficient, limit of detection, limit of quantitative and linear range for methyl EPA, DPA and DHA determination

名称	线性方程	相关系数	检出限( $\mu\text{g/mL}$ )	定量限( $\mu\text{g/mL}$ )	线性范围
EPA	$Y=2.7 \times 10^{-3}X+39.0$	0.9996	8.7	28.7	50~5000 $\mu\text{g/mL}$
DPA	$Y=2.9 \times 10^{-3}X+57.3$	0.9993	13.2	43.6	50~5000 $\mu\text{g/mL}$
DHA	$Y=2.5 \times 10^{-3}X+44.9$	0.9996	15.2	50.1	50~5000 $\mu\text{g/mL}$

表 2 校正因子( $n=6$ )  
Table 2 Correction factor ( $n=6$ )

校正因子 $f$	次数							平均值
	1	2	3	4	5	6		
EPA	0.89	0.89	0.90	0.91	0.88	0.89	0.89	
DPA	1.38	1.41	1.40	1.41	1.40	1.34	1.39	
DHA	1.49	1.46	1.48	1.47	1.45	1.47	1.47	

表 3 外标法精密度测定结果( $n=6$ )  
Table 3 Precision of external standard method on determination results ( $n=6$ )

样品测试次数	EPA,%	DPA,%	DHA,%
1	6.28	3.78	7.63
2	6.48	3.88	7.87
3	6.26	3.73	7.64
4	6.27	3.71	7.72
5	6.08	3.64	7.58
6	6.32	4.08	8.52
6 次测定平均值	6.28	3.80	7.83
6 次含量测试 CV 值,%	2.04	4.14	4.53

表 4 内标法精密度测定结果( $n=6$ )  
Table 4 Precision of internal standard method on determination results ( $n=6$ )

样品测试次数	EPA,%	DPA,%	DHA,%
1	6.75	3.70	7.40
2	6.38	3.21	6.76
3	6.05	3.30	7.01
4	6.28	3.39	7.06
5	7.08	3.75	7.16
6	6.68	3.61	7.66
6 次测定平均值	6.54	3.49	7.18
6 次含量测试的 CV 值,%	5.68	6.41	4.40

### 3.6 方法回收率实验

#### 3.6.1 外标法

取 0.2500 g 海豹油样品, 往样品中加入一定量的 EPA、DHA 和 DPA 甲酯标准溶液, 按照 2.5.1 所述步骤进行样品处理, 2.6.1 所述步骤进行样品定量分析, 结果见表 5。

由表 5 可知, 对同一个海豹油样品进行外标法重复测定 3 次回收率, EPA 平均回收率为 92.3%, DPA 平均回收率为 97.3%, DHA 的平均回收率为 100.2%, 从平均回收率的数值可以看出, 外标法的回收率良好, 说明外标法测定结果理想可靠, 所测结果具有很好的准确性。

#### 3.6.2 内标法

取 0.2500 g 海豹油样品, 往样品中加入一定量的 EPA、DHA 和 DPA 甲酯标准溶液, 按照 2.5.2 所述步骤进行样品处理, 2.6.2 所述步骤进行样品定量分析,

结果见表 6。

由表 6 可知, 对同一个海豹油样品进行内标法重复测定 3 次回收率, EPA 平均回收率为 95.4%, DPA 平均回收率为 88.0%, DHA 的平均回收率为 86.8%, 从平均回收率的数值可以看出, 内标法的回收率良好, 说明内标法测定结果理想可靠, 所测结果具有很好的准确性。

### 3.7 本方法与国标 GB 5009.168-2003<sup>[17]</sup>、GB/T 22223-2008 和 SN/T 2922-2011 结果比较

用本方法同国标 GB 5009.168-2003、GB/T 22223-2008 和 SN/T 2922-2011 对同一个海豹油样品进行检测, 每种方法重复测定 6 次, 取平均值, 结果保留至小数点后两位。

所有数据用 SPSS17.0 软件进行处理, 不同方法间的差异采用 *t* 检验分析。结果见表 7、表 8。

表 5 外标法回收率  
Table 5 Recoveries of external standard method

名称	本底值(μg)	样品质量(g)	添加量(μg)	检测结果(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
EPA	8462.96	0.1304	8847.24	16956.57	96.0	92.3
				16638.96	92.4	
				16288.81	88.5	
DPA	5137.76	0.1304	5893.60	11117.56	101.5	97.3
				10808.35	96.2	
				10697.47	94.3	
DHA	10523.28	0.1304	10771.66	21807.04	104.8	100.2
				21261.81	99.7	
				20874.06	96.1	

表 6 内标法回收率  
Table 6 Recoveries of internal standard method

名称	本底值(μg)	样品质量(g)	添加量(μg)	检测结果(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)
EPA	8867.2	0.1304	8847.24	16793.90	89.6	95.4
				17701.58	99.9	
				17432.61	96.8	
DPA	4746.56	0.1304	5893.60	9522.86	81.0	88.0
				10160.23	91.9	
				10120.29	91.2	
DHA	9714.8	0.1304	10771.66	17869.84	75.7	86.8
				20133.64	96.7	
				19189.81	88.0	

表7 不同方法测定结果比较表( $n=6$ )  
Table 7 Comparison of determination results by different methods ( $n=6$ )

方法	EPA(%)	DPA(%)	DHA(%)
本实验外标法	6.28±0.061	3.80±0.042	7.83±0.095
GB/T 5009.168-2003	6.30±0.060	---	7.75±0.060

表8 不同方法测定结果比较表( $n=6$ )  
Table 8 Comparison of determination results by different methods ( $n=6$ )

方法	EPA(%)	DPA(%)	DHA(%)
本实验内标法	6.54±0.068	3.49±0.070	7.18±0.083
GB/T 22223-2008	6.50±0.068	3.55±0.042	7.28±0.088
SN/T 2922-2011	6.48±0.060	---	7.25±0.120

将 EPA 和 DHA 的测定值进行两组独立样本的  $t$  检验, 统计结果为: 两组间 EPA 的测定值比较所得  $t=0.988$ ,  $P=0.347$ , DHA 的测定值比较所得  $t=-1.301$ ,  $P=0.223$ 。

将外标法的测定结果同 GB/T 5009.168-2003 的测定结果进行统计分析, 结果表明, 两种方法对于 EPA 和 DHA 的测定在统计学上没有差异, 间接证明了本方法的可行性, 对比两种方法在样品处理过程中有很大的不同, 国家标准中是采用了氢氧化钠甲醇皂化, 然后用盐酸甲醇进行甲酯化, 并且在制备过程中用到了 50 °C 水浴加热, 在实验过程中无论时间还是操作的简易程度上, 本实验方法都有极大的改进和优势。

将内标法对 EPA、DPA、DHA 的测定值同其他两个国家标准的测定值进行  $t$  检验, 内标法与 GB/T 22223-2008 对 EPA 测定值进行比较,  $P=0.332$ , 对 DPA 测定值比较所得  $P=0.055$ , 对 DHA 比较所得  $P=0.291$ ; 内标法与 SN/T 2922-2011 对 EPA 测定值进行比较,  $P=0.112$ , 对 DHA 比较所得  $P=0.528$ 。

将内标法的测定结果同 GB/T 22223-2008、SN/T 2922-2011 测定结果进行比较, 结果表明, 两种方法对于 EPA 和 DHA 的测定在统计学上没有差异, 因而也进一步证明, 所建立的方法对于海豹油中 EPA、DPA、DHA 的测定是可靠的, 准确的。对比不同标准之间的实验操作过程, 本研究中建立的方法, 在样品

的处理过程中, 极大的简化了实验操作步骤和实验时间, 在样品的检测过程, 所用的时间也极大的缩短了, 这显示出所建立方法的极大优势。

### 3.8 样品中 EPA、DHA 和 DPA 含量测定

对以往市售的 3 批次海豹油样品用本实验的两种方法进行样品的重复测定, 测定结果与本实验的研究样品 6 次测定平均结果比较, EPA、DPA、DHA 的 CV% 都小于 10%, 说明不同批次的海豹油中 EPA、DPA、DHA 的含量稳定。测定结果见表 9 和表 10。

对 3 批次样品测定结果进行方法学比较, 即内标法和外标法之间对 EPA、DPA 和 DHA 的结果比较, CV% 小于 10%, 说明本实验的两种方法对于进口同一产地和企业来源的海豹油中 3 项多不饱和脂肪酸测定结果是一致的, 差别在允许误差范围内。结果见表 11。

## 4 结论

本研究建立的海豹油中 EPA、DPA 和 DHA 多重测定方法有针对性地进行了样品前处理、仪器条件等方面的优化, 重现性、回收率和稳定性良好, 方法的线性、灵敏度、检出限和精密度均满足分析要求。且方法的测定结果与国家标准方法的测定结果相比, 在统计学上没有差异, 但操作比国家标准更简易快捷, 可用于对进口海豹油中 EPA、DPA 和 DHA 的含量进行简便和准确的测定。

表 9 外标法对 3 批次样品结果比较( $n=6$ )Table 9 Comparison of determination results by external standard method for 3 batches samples ( $n=6$ )

样品名称	原样品批号	样品编号	项目	不同批次样品 外标法检测结果	实验研究样品 外标法测定结果	CV%
海豹油丸 718863	718863	20150030	EPA(%)	5.74	6.28	6.41
			DPA(%)	3.65	3.80	2.92
			DHA(%)	7.85	7.83	0.14
海豹油丸 720116	720116	20150031	EPA(%)	5.74	6.28	6.34
			DPA(%)	3.70	3.80	1.92
			DHA(%)	7.61	7.83	1.97
海豹油丸 720114	720114	20150032	EPA(%)	5.72	6.28	6.63
			DPA(%)	3.63	3.80	3.30
			DHA(%)	7.76	7.83	0.66

表 10 内标法对 3 批次样品测定结果比较( $n=6$ )Table 10 Comparison of determination results by internal standard method for 3 batches samples ( $n=6$ )

样品名称	样品批号	样品编号	项目	不同批次样品 内标法检测结果	实验研究样品 内标法测定结果	CV%
海豹油丸 718863	718863	20150030	EPA(%)	5.80	6.54	8.54
			DPA(%)	3.53	3.49	0.90
			DHA(%)	7.19	7.18	0.05
海豹油丸 720116	720116	20150031	EPA(%)	5.77	6.54	8.83
			DPA(%)	3.60	3.49	2.23
			DHA(%)	7.10	7.18	0.76
海豹油丸 720114	720114	20150032	EPA(%)	5.82	6.54	8.19
			DPA(%)	3.47	3.49	0.46
			DHA(%)	6.81	7.18	3.74

表 11 本方法中外标、内标法对 3 批次样品测定结果比较

Table 11 Comparison of determination results by external and internal standard method for 3 batches samples

样品名称	样品批号	样品编号	项目	外标法	内标法	CV%
海豹油丸 718863	718863	20150030	EPA(%)	5.74	5.80	0.68
			DPA(%)	3.65	3.53	2.27
			DHA(%)	7.85	7.19	6.25
海豹油丸 720116	720116	20150031	EPA(%)	5.74	5.77	0.39
			DPA(%)	3.70	3.60	1.90
			DHA(%)	7.61	7.10	4.88
海豹油丸 720114	720114	20150032	EPA(%)	5.72	5.82	1.28
			DPA(%)	3.63	3.47	3.24
			DHA(%)	7.76	6.81	9.22

## 参考文献

- [1] 郝颖, 汪之和. EPA、DHA 的营养功能及其产品安全性分析[J]. 现代食品科技, 2006, 22(3): 180-183.  
Hao Y, Wang ZH. Nutritive function and safety analysis of EPA and DHA [J]. Mod Food Sci Technol, 2006, 22(3): 180-183.
- [2] 李妍, 王静, 李麒龙, 等. EPA 与 DHA 的最新研究进展[J]. 农产品加工·学刊, 2013, 2: 7-13.  
Li Y, Wang J, Li QL, *et al.* The recent advance in the studies on EPA and DHA [J]. Acad Period Farm Prod Proc, 2013, 2: 7-13.
- [3] 孟庆玲. 海豹油: 珍贵的保健品[J]. 食品安全导刊, 2014, 25: 78.  
Meng QL. Seal oil: precious health care products [J]. China Food Saf, 2014, 25: 78.
- [4] 常东亮, 哈成勇. 海豹油中脂肪酸的气相色谱-质谱分析[J]. 分析化学研究简报, 1997, 25(12): 1407-1409.  
Chang DL, Ha CY. Analysis of fatty acids in seal oil by GC-MS [J]. Chin J Anal Chem, 1997, 25(12): 1407-1409.
- [5] 李殿鑫, 陈银基, 周光宏, 等. *n-3* 多不饱和脂肪酸分类、来源与疾病防治功能[J]. 中国食物与营养, 2006, 6: 52-54.  
Li DX, Chen YJ, Zhou GH, *et al.* The classification, source and disease control function of *n-3* polyunsaturated fatty acid [J]. Food Nutr China, 2006, 6: 52-54.
- [6] 王向群, 陈丽娟. *n-3* 多不饱和脂肪酸抗肿瘤机制的研究进展[J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(3): 321-324.  
Wang LQ, Chen LJ. Research progress of antitumor mechanism of *n-3* polyunsaturated fatty acids [J]. Pract J Cancer, 2011, 26(3): 321-324.
- [7] 孙焕, 张春红, 黄晓杰. 酶改性大豆分离蛋白作为壁材微胶囊化海豹油研究[J]. 粮食与油脂, 2006, (5): 3-5.  
Sun H, Zhang CH, Huang XJ. Enzymatic modified soybean protein isolated as seal oil microcapsules wall material research [J]. J Grain Oil, 2006, (5): 3-5.
- [8] Conquer JA, Cheryk LA, Chan E, *et al.* Effect of supplementation with dietary seal oil on selected cardiovascular risk factors and hemostatic variables in healthy male subjects [J]. Throm Res, 1999, 96(3): 239-250.
- [9] Arslang, Brunborg LA, Froyland L, *et al.* Effects of duodenal seal oil administration in patients with inflammatory bowel Disease [J]. Chem Mater Sci, 2002, 37(10): 935-940.
- [10] Murphy MG, Wright V, Ackman RG, *et al.* Diets enriched in menhaden fish oil, seal oil, or shark liver oil have distinct effects on the lipid and fatty-acid composition of guinea pig heart [J]. Biomed Life Sci, 1997, 177(1): 257-269.
- [11] 杨守美. *n-3* 多不饱和脂肪酸[J]. 医药产业资讯, 2006, (5): 3-15.  
Yang SM. *N-3* polyunsaturated fatty acids [J]. J Med Ind Inform, 2006, (5): 3-15.
- [12] Burr M L, Fehily AM, Gilbert JF, *et al.* Effects of changes in fat fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction diet and reinfarction trial (DART) [J]. Lancet 1989, (5): 2757-2761.
- [13] Montori VM, Farmer A, Wollan PC, *et al.* Fish oil supplementation in type 2 diabetes: a quantitative systematic review [J]. Diabetes Care, 2000, 23, (9): 147-145.
- [14] 卢定强, 陈庶来, 陈钧. 二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸的代谢和生理机能[J]. 江苏理工大学学报, 1998, 19(3): 29-35.  
Lu DQ, Chen SL, Chen G. Metabolic and physiological functions of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid [J]. J Jiangsu Sci Technol Univ, 1998, 19(3): 29-35.
- [15] SN/T 2922-2011 出口食品中 EPA 和 DHA 的测定 气相色谱法[S].  
SN/T 2922-2011 Determination of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in foods for export-Gas chromatography [S].
- [16] GB/T 22223-2008 食品中总脂肪、饱和脂肪、不饱和脂肪的测定 水解提取-气相色谱法[S].  
GB/T 22223-2008 Determination of total fat, saturated fat, and unsaturated fat in foods-Hydrolytic extraction-gas chromatography [S].
- [17] 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].

(责任编辑: 杨翠娜)

## 作者简介



胡焯敏, 本科, 助理工程师, 主要研究方向为食品化学检验。  
E-mail: yemi1213@126.com



陈金显, 博士, 主要研究方向为食品科学与加工。  
E-mail: juliankc@pb95.com



焦红, 研究员, 主要研究方向为食品安全与营养学分析技术。  
E-mail: jhciq1228@163.com