

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20250106006

引用格式: 胡立威, 方超华, 王秋实, 等. 基于新方法检测天然鱼肝油中维生素 A 和不饱和脂肪酸[J]. 食品安全质量检测学报, 2025, 16(6): 208–215.

HU LW, FANG CH, WANG QS, *et al.* Identification of vitamin A and unsaturated fatty acid in natural cod liver oil based on a new method [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2025, 16(6): 208–215. (in Chinese with English abstract).

基于新方法检测天然鱼肝油中维生素 A 和 不饱和脂肪酸

胡立威, 方超华, 王秋实, 彭鼎新, 关丽萍*

(浙江海洋大学食品与药学学院, 舟山 316022)

摘要: 目的 建立新方法简便鉴别天然鱼肝油中维生素 A (vitamin A, VA) 和不饱和脂肪酸的含量。**方法** 将鱼肝油样品经皂化后注入高效液相色谱系统, 检测 VA 的含量。将鱼肝油及其辅料皂化后注入气相色谱系统, 分析其中亚油酸、二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)定位以及所占百分比, 将鱼油与植物油进行鉴别与区分。**结果** 在新方法下, VA 浓度在 30.00~1500.00 IU/mL 范围内线性关系良好($r^2=0.9999$); 平均回收率为 96.1%; 仪器精密度的相对标准偏差为 0.18%, 方法精密度的相对标准偏差为 1.13%, 中间精密度的相对标准偏差为 0.98%。各类植物油与鱼油及鱼肝油中脂肪酸含量差异显著, 鱼肝油、鱼油中 EPA、DHA 含量丰富, 亚油酸含量少; 玉米油、菜籽油、橄榄油中均不含 EPA 和 DHA, 但亚油酸含量丰富。**结论** 本研究建立的检测方法简便准确, 可用于鱼肝油中 VA 和不饱和脂肪酸含量测定, 为制定理想的质量标准奠定基础。

关键词: 鱼肝油; 维生素 A; 不饱和脂肪酸; 定量检测

Identification of vitamin A and unsaturated fatty acid in natural cod liver oil based on a new method

HU Li-Wei, FANG Chao-Hua, WANG Qiu-Shi, PING Ding-Xin, GUAN Li-Ping*

(Food and Pharmacy College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

ABSTRACT: Objective To establish a new method for simple identification of vitamin A (VA) and unsaturated fatty acids in natural cod liver oil. **Methods** The cod liver oil sample was saponified and injected into a high-performance liquid chromatography system to detect the content of VA. After saponification of cod liver oil and its excipients, injected them into a gas chromatography system to analyze the localization and percentage of linoleic acid, eicosapentaenoic acid (EPA), and docosahexaenoic acid (DHA), and distinguish fish oil from vegetable oil. **Results** Under the new method, the linear relationship of VA concentration was good within the range of 30.00–1500.00 IU/mL ($r^2=0.9999$); the average recovery rate was 96.1%. The relative standard deviation of

收稿日期: 2025-01-06

第一作者: 胡立威(1995—), 男, 硕士, 主要研究方向为食品安全。E-mail: 785616063@qq.com

*通信作者: 关丽萍(1970—), 女, 博士, 教授, 主要研究方向为食品安全与药物合成。E-mail: glp730@zjou.edu.cn

instrument precision was 0.18%, the relative standard deviation of method precision was 1.13%, and the relative standard deviation of intermediate precision was 0.98%. There was a significant difference in the content of fatty acids between vegetable oils, fish oil and cod liver oil. Cod liver oil and fish oil were rich in EPA and DHA, while linoleic acid was low. Corn oil, rapeseed oil and olive oil did not contain EPA and DHA, but they were rich in linoleic acid. **Conclusion** The detection method establish in this article is simple and accurate, and can be used for the determination of VA and unsaturated fatty acid content in cod liver oil, laying the foundation for the development of ideal quality standards.

KEY WORDS: cod liver oil; vitamin A; unsaturated fatty acids; quantitative determination

0 引言

在过去的几十年里, 营养保健品引起了全球关注, 并且处于不断增长的趋势^[1]。它虽然不能替代药品, 但是在对抗和缓解与生活方式相关的疾病和障碍方面发挥着重要作用, 如降低患癌症、心脏病、高血压、动脉粥样硬化、高胆固醇、糖尿病和许多其他生活方式相关疾病的风险^[2-4]。鱼肝油是从鱼类肝脏中提取出的一类富含维生素 A (vitamin A, VA)、维生素 D (vitamin D, VD) 以及多不饱和脂肪酸的脂肪油^[5], 在 1979 年作为药品被收录在《中国药典》中。鱼肝油中含有丰富的生物活性物质, 可有效调节人体健康状态^[6], 其中, VA 可预防夜盲症, 还有助于保护皮肤, 调节代谢平衡^[7]; VD 有助于人体钙、磷的吸收, 预防佝偻病, 还可降低罹患癌症的风险^[8-10]; ω -3 不饱和脂肪酸可提高自身免疫力、提高记忆力以及预防和治疗心血管疾病, 同时也具有促进大脑视网膜发育, 改善视力, 促进婴幼儿智力发育和改善非酒精性脂肪肝病的功能^[11-15]。多年来, 鱼肝油是婴幼儿食用保健品之一, 孕妇、儿童食用鱼肝油有高度的安全性且有益健康。因此对鱼肝油中成分的含量检测非常重要。

VA 是一种天然微量营养素, 是第一个被发现的脂溶性维生素, VA 的生物活性分子形式主要为视黄醇(维生素 A 醇)、维甲酸、视黄素等, 其中视黄醇是 VA 对视觉系统起作用至关重要的因素^[16], VA 缺乏症仍然是造成可预防失明的主要原因。除了治疗视力问题外, VA 还有抗炎、抑制细胞凋亡、抗肿瘤和增强免疫力等功能^[17-22]。VA 的缺乏和过量摄入都会导致严重的健康后果。VA 是孕妇及其胎儿的重要微量营养素。除了对形态和功能发育以及眼部完整性至关重要外, VA 还对胎儿器官和胎儿骨骼产生全身性影响^[23]。因此, 怀孕期间孕妇对 VA 的需求量增大。然而在怀孕期间摄入过多的 VA 也会造成不良影响, 如果摄入过量, 可能会引起胎儿中枢神经和心血管系统的先天性畸形以及自然流产^[24-25]。因此孕妇在怀孕期间食用鱼肝油补充 VA 需要注意其中 VA 含量以免对自身及胎儿造成影响。药典中 VA 测定法主要有紫外-可见分光光度法和高效液相色谱法, 紫外分光光度法在测定时需使用校正公式校

正非 VA 物质的无关吸收产生的误差。高效液相色谱法中直接将样品溶解离心及可进样, 无复杂前处理过程, 但是测定的是 VA 醋酸酯的含量。由于无法直接检测出鱼肝油中 VA 含量, 本研究在药典方法的基础上加以改进, 在前处理过程中加入皂化过程, 并将皂化过的样品注入反相色谱液相系统, 经过优化色谱条件, 成功建立了一个适合油脂样品中 VA 含量的检测方法。

ω -3 多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA) 在治疗心血管疾病和降低神经精神疾病风险方面发挥着重要作用^[26-28]。海洋来源的长链 ω -3 PUFA 是细胞膜的关键成分, 可作为功能性食品和膳食补充剂。鱼油中最常见的 ω -3 PUFA 为二十碳五烯酸 (eicosapentaenoic acid, EPA) 和二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA), 定期补充 ω -3 PUFA 可降低血压并且降低胰岛素、胆固醇和总脂质水平^[29-30]。 ω -3 PUFA 在机体代谢过程中起着重要的介质作用, 它们通过不同的机制调节代谢参数, 包括与其他营养物质的相互作用以及对参与脂质和葡萄糖代谢的基因表达的影响^[31]。在饮食中增加 ω -3 PUFA 的摄入可能是降低代谢综合征患病风险的有效措施^[32]。市场中鱼肝油产品多数以鱼油作为辅料调配而成, 鱼油中富含 EPA 和 DHA, 可适当调节鱼肝油产品中 EPA 和 DHA 含量占比。然而植物油与鱼油外观并无明显差异, 但植物油中不含 EPA 和 DHA, 且价格低廉, 部分商家会使用植物油代替鱼油作为辅料调配鱼肝油, 大大降低了鱼肝油产品的质量。

市场中, 鱼肝油作为可补充 VA、VD、EPA 和 DHA 等营养物质的产品被人们所认可。然而, 目前对鱼肝油的质量没有完善的评价标准。在保健品领域, 许多商家将“人工添加型”鱼肝油(添加人工合成维生素)定义为天然鱼肝油, 在药品领域, 许多人将天然鱼肝油与维生素 AD 滴剂混淆。天然鱼肝油为天然提取物, 富含天然 VA 以及天然 VD, 不同于人工调配出的鱼肝油, 也不同于富含人工合成维生素的维生素 AD 滴剂。本研究通过建立含量测定新方法对鱼肝油中 VA 进行分析研究, 使用气相色谱法分析鱼肝油中各类脂肪酸占比, 达到区分天然鱼肝油和人工合成鱼肝油以及维生素 AD 滴剂的目的, 有效评价鱼肝油的质量。

1 材料与amp;方法

1.1 材料与试剂

粗制鱼肝油以鳕鱼、鲑鱼、金枪鱼鱼肝油为原料调配出 VA 与 VD 的比例为 3:1(参考维生素 AD 滴剂的比例)的鱼肝油,用于实验研究。

维生素 A 醋酸酯对照品(100 万 IU/g, 山东优素化工科技有限公司); 维生素 AD 滴剂(VA 1800 IU/粒, VD 600 IU/粒, 浙江仟源海力生制药有限公司); 脂肪酸甲酯标准品(美国 NU-CHEK-PREP, INC 公司); 深海鱼油(华北制药集团维灵保健品有限公司); 鳕鱼(VA 3176.3 IU/g, VD 微量, 舟山菜市场采购); 鲑鱼(VA 17373.2 IU/g, VD 803.6 IU/g)、金枪鱼肝油(VA 17472.3 IU/g, VD 28747.4 IU/g)(浙江海力生集团研究院); 玉米油、菜籽油(益海嘉里金龙鱼食品集团股份有限公司); 橄榄油(欧丽薇兰)。

正己烷(色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司); 乙醇(分析纯)、甲醇(色谱纯)(国药集团化学试剂有限公司); 氢氧化钾(分析纯)、氢氧化钾甲醇溶液(浓度 0.5 mol/L)、饱和氯化钠溶液(纯度 99.5%, 上海麦克林生化科技股份有限公司); 三氟化硼甲醇溶液(浓度 15%, 国药集团化学试剂有限公司)。

1.2 仪器与设备

UV1200 型紫外可见分光光度计(上海美谱达仪器有限公司); 1220 Infiniti II LC 高效液相色谱仪、LC210 高效液相色谱仪、7890B 气相色谱仪、HP-5 毛细管色谱柱(0.32 mm×30 m, 0.25 μm)(美国安捷伦科技有限公司); Silversil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm)(北京迪马科技公司); 硅胶色谱柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm)(大连依利特分析仪器有限公司); HWS26 电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司); TGL-16C 高速离心机(上海海安亭科学仪器有限公司); CH-04BM 超声波清洗机(苏州创音唯能超声设备有限公司); 104E/02 电子分析天平(精度 0.1 mg, 瑞士梅特勒托利多国际有限公司); EYELA OSB-2200 旋转蒸发仪(东京理化器械株式会社)。

1.3 实验方法

1.3.1 维生素 A 含量测定新方法

由于紫外-可见分光光度法与高效液相色谱法都无法准确测定鱼肝油中 VA 含量, 参考结合药典中几种测定方法, 建立新的 VA 含量测定方法, 并进行方法学验证。

(1) 溶液配制

标准品溶液配制: 称取 VA 醋酸酯 0.025 g 于皂化瓶中, 加入乙醇 30 mL, 50% 氢氧化钾 3 mL, 90 °C 水浴锅加热 30 min, 冷凝回流。冷却后, 10 mL 纯水冲洗冷凝管, 收集皂化液至分液漏斗, 皂化瓶用 80 mL 水洗涤 3 次, 洗液并入分液漏斗。用不含过氧化物的乙醚振荡萃取 3 次, 3 次

用量分别为 60、40、40 mL, 合并乙醚液后用水洗涤 3 次。洗涤时避免乳化, 酚酞指示液检测是否洗涤干净。分取乙醚提取液, 加入干燥滤纸条除去提取液中残留的水分, 再用乙醚洗涤分液漏斗及滤纸条, 洗液与提取液合并于圆底烧瓶中, 水浴低温蒸发至 5 mL 左右, 氮气吹干, 迅速加入 5 mL 甲醇, 密塞, 超声处理助溶, 12000 r/min 离心 5 min, 作为对照品溶液。

供试品溶液的配制: 称取维生素 AD 滴剂 1.2 g, 参照上述皂化方法, 制得供试品①, 称取鱼肝油 0.2 g, 参照上述皂化方法, 制得供试品②。

(2) 色谱条件

色谱柱: C₁₈ 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: A 相为甲醇, B 相为水, 梯度条件见表 1; 进样量 10 μL; 流速 1.0 mL/min; 检测波长 325 nm; 柱温 40 °C。

表 1 流动相梯度条件

Table 1 Gradient conditions of mobile phase

时间/min	甲醇/%	水/%
0.00	81	19
5.00	85	15
8.00	95	5
12.00	95	5
13.00	81	19
18.00	81	19

(3) 维生素 A 含量测定

取对照品溶液、供试品①和供试品②各 5 mL, 取进样量注入液相色谱系统, 在 1.3.1(2)色谱条件下进行 VA 的含量分析。

1.3.2 鱼肝油中辅料油的检测

(1) 溶液配制

对照品: 精密称取脂肪酸甲酯对照品 0.01 g 于 100 mL 容量瓶中, 正己烷定容, 作为对照品溶液。

鱼油样品: 称取鱼油 0.10 g 置于皂化瓶中, 加入 50% 氢氧化钾甲醇溶液 5 mL, 氮气保护下, 在 75 °C 水浴条件下冷凝回流 30 min, 待油脂溶解, 冷却后加 15% 三氟化硼甲醇溶液 5 mL, 充氮后 75 °C 水浴条件下酯化 15 min。静置冷却后加入 5 mL 正己烷, 完全溶解后加入 5 mL 饱和氯化钠溶液。

鱼肝油样品: 称取 0.10 g 鱼肝油置于皂化瓶中, 甲酯化处理过程与鱼油样品相同。

植物油样品: 分别称取玉米油、菜籽油、橄榄油各 0.10 g 置于皂化瓶, 甲酯化处理过程与鱼油样品相同。

混合油样品: 将适量的鱼油、植物油混合称取 0.10 g(鱼油与植物油的体积比为 9:1, 植物油种类随机), 甲酯化处理过程与鱼油样品相同。

(2) 色谱条件

色谱柱: HP-5 毛细管色谱柱(0.32 mm×30 m, 0.25 μm); 进样口温度: 250 °C; 检测器温度: 270 °C; 流动相: 氮气, 1 mL/min; 柱温: 升温程序(表 2)。

表 2 升温程序

Table 2 Temperature program

速率/(°C/min)	温度/°C	保持时间/min	运行时间/min
0	160	5	5
5	190	5	16
2	230	20	56

气体流速: 氮气(载气): 25 mL/min, 氢气: 30 mL/min, 空气: 400 mL/min。进样量: 1 μL, 分流比 40:1。

(3) 鱼油、鱼肝油、各类植物油以及混合油脂脂肪酸检测 取上述各样品溶液, 按照 1.3.2(2) 色谱条件进样, 分析其中亚油酸、EPA 和 DHA 定位以及所占百分比, 将鱼油与植物油进行鉴别与区分。

1.4 数据处理

本研究中引用的图谱和表格采用 Excel 2021 和 SPSS 24.0 进行数据处理, 每组实验均 3 次平行, 以平均值作为最后结果。

2 结果与分析

2.1 维生素 A 含量测定新方法

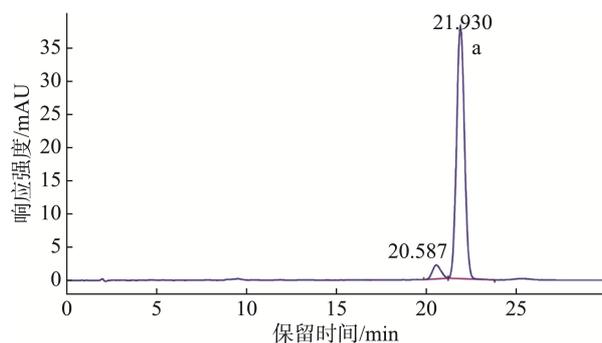
紫外分光光度计法所测得吸光度不是 VA 的独有吸收, 在规定条件下, 非 VA 物质的吸收所引起的误差可用校正公式校正^[33], 但鱼肝油中成分相对复杂, 经皂化后的鱼肝油仍无法使用紫外分光光度计法测得 VA 含量, 需再经过净化制备后才能使用紫外分光光度法有效测得其 VA 含量。高效液相色谱法适用于 VA 醋酸酯及其制剂中 VA 含量测定, 鱼肝油中所含有的 VA 为天然 VA, 不以 VA 醋酸酯的形式存在。

药典方法中, 样品皂化后注入液相系统进行制备, 将制备后的 VA 样品再次进行紫外分光光度法检测, 步骤相对烦琐且易产生误差。而 VA 醋酸酯的高效液相法没有皂化过程, 不进行制备, 直接将样品溶解后注入正相色谱系统进行检测, 无法测得天然鱼肝油的 VA 含量。本研究将皂化过的样品注入反相色谱液相系统, 经过优化色谱条件, 成功建立了一个适合油脂样品中 VA 含量的检测方法, 其保留时间在 21 min 左右, 分离度较好(图 1)。

2.1.1 鱼肝油中维生素 A 含量测定

该方法可以有效分析测定鱼肝油中 VA 含量, 由于使用色谱柱不同, 出峰时间在 31 min 左右(表 3), 计算得维生

素 AD 滴剂 VA 含量为 4712.79 IU/g, 自制调配鱼肝油中 VA 含量为 21083.56 IU/g。药典方法中高效液相法测定的 VA 是 VA 醋酸酯, 而鱼肝油中天然 VA 的存在形式不是 VA 醋酸酯。天然 VA 经皂化过程转化为视黄醇, 可以通过本研究建立的 VA 检测方法进行分析。



注: a. 视黄醇。

图 1 新方法测定 VA 图谱

Fig.1 Chromatogram of new method for determination of VA

表 3 峰时间与 VA 含量

Table 3 Peak time and VA content

	峰时间/min	含量/(IU/g)
VA 醋酸酯	31.51	10 ⁷
AD 滴剂	30.54	4712.79
调配鱼肝油	30.60	21083.56

2.2 方法学验证

2.2.1 专属性

称取适量 VA 醋酸酯对照品, 经皂化操作后, 在检测 VA 色谱条件下进样, 考察视黄醇出峰状态。称取适量辅料(药用大豆油), 经皂化操作后, 在检测 VA 色谱条件下进样, 检测辅料在维生素 A 醇出峰保留时间内是否有干扰。视黄醇出峰时间在 21 min 左右, 峰型和分离度较好, 空白辅料在视黄醇出峰处无干扰(图 2)。

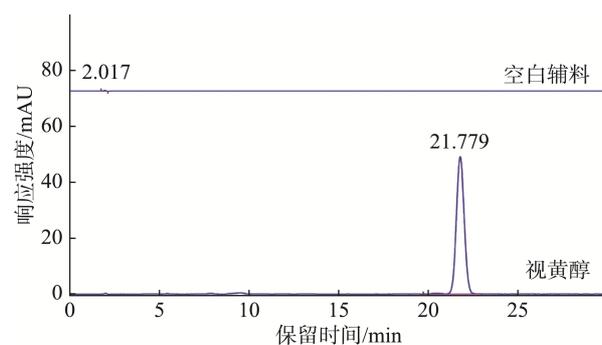


图 2 专属性实验

Fig.2 Experiment of exclusive

2.2.2 线性关系

取 VA 对照品溶液分别稀释 2、5、10、20、50 倍, 皂化后在检测 VA 色谱条件下分别进样, 记录色谱图。以 VA 浓度为横坐标(X , IU/mL), 峰面积(Y)为纵坐标, 建立标准曲线。线性回归方程为 $Y=14.007X+65.252$, $r^2=0.9999$ 。VA 含量测定新方法在 30.00 IU/mL 至 1500.00 IU/mL 的浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 准确性

由于样品的特殊性, 选择 50%、100%、150% 的浓度进行加样, 每个浓度分别制备 3 份, 将实测值与理论值比较, 计算回收率, 结果见表 4。由表 4 可知平均回收率为 96.10%, 该方法回收率高。

表 4 回收率试验结果
Table 4 Test results of recovery

加样比例/%	加样量/($\mu\text{g/mL}$)	实测量/($\mu\text{g/mL}$)	回收率/%	平均回收率/%
50	25.00	23.45	93.80	93.37
	25.00	22.87	91.48	
	25.00	23.72	94.88	
100	50.00	51.53	103.06	98.34
	50.00	48.76	97.52	
	50.00	47.22	94.44	
150	75.00	72.19	96.25	96.58
	75.00	73.55	97.93	
	75.00	71.67	95.56	

2.2.4 精密度

取皂化后的 VA 对照品溶液进样, 进样量 10 μL , 重复测定 6 次, 记录色谱图峰面积, 并计算相对标准偏差 (relative standard deviation, RSD) 值为 0.18% (表 5)。

表 5 仪器精密度试验结果
Table 5 Instrumental precision test results

序号	1	2	3	4	5	6
峰面积/ \AA	1410.3	1404.0	1403.4	1406.2	1403.8	1405.3
平均峰面积/ \AA	1405.5					
RSD/%	0.18					

精密度试验: 使用皂化方法制备 6 份 VA 供试品, 在 VA 含量检测色谱条件下进样, 重复测定 6 次, 计算样品中 VA 含量, 并计算 RSD 值为 1.13% (表 6)。

表 6 方法精密度试验结果
Table 6 Method precision test results

序号	1	2	3	4	5	6
含量/(IU/g)	4763.05	4679.36	4765.42	4840.19	4805.43	4778.87
平均含量/(IU/g)	4772.05					
RSD/%	1.13					

中间精密度试验: 取同一批 VA 待测样品, 在不同的时间使用不同的仪器对其 VA 含量进行测定, 记录 VA 含量测定结果, 计算 RSD 值为 0.98% (表 7)。各精密度试验 RSD 值均小于 2%, 该方法精密度良好。

表 7 中间精密度试验结果
Table 7 Test results of intermediate precision

	仪器 1		仪器 2	
	第 1 d	第 2 d	第 1 d	第 2 d
含量(IU/g)	4762.43	4795.26	4812.66	4705.98
平均含量(IU/g)	4769.08			
RSD/%	0.98			

2.2.5 稳定性

取皂化后的 VA 供试品, 分别在 0、2、4、24、48 h 进样, 记录色谱图, 计算峰面积变化率, 结果见表 8, 皂化后的样品在 24 h 内稳定性良好。48 h 峰面积的增加可能与溶剂挥发有一定关系。

表 8 稳定性试验结果
Table 8 Test results of stability

进样时间/h	峰面积	峰面积变化率/%
0	1410.3	100.00
2	1406.2	99.71
4	1405.2	99.64
24	1407.2	99.78
48	1492.2	105.81

2.2.6 方法学验证结果

根据该 VA 含量测定新方法的方法学试验结果, 综合上述数据, 视黄醇浓度在 30.00~1500.00 IU/mL 范围内线性关系良好 ($r^2=0.9999$); 平均回收率为 96.10%; 仪器精密度的相对标准偏差为 0.18%, 方法精密度的相对标准偏差为 1.13%, 中间精密度的相对标准偏差为 0.98%; 皂化后的供试品溶液在 24 h 内具有良好的稳定性。得出该方法具有专属性高、精密度高、回收率高、简便易行的特点, 能够准确可靠地测定 VA 的含量。

2.3 气相色谱条件优化

参照鳕鱼肝油掺假植物油的指纹图谱鉴定实验^[34], 将初始色谱条件设置为: HP-5 毛细管色谱柱(0.32 mm \times 30 m, 0.25 μm); 进样口温度 220 $^{\circ}\text{C}$; 检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$; 流动相为氮气; 流速 1 mL/min; 色谱柱升温程序 1 (表 9)。

表 9 升温程序 1
Table 9 Temperature program 1

速率/($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	温度/ $^{\circ}\text{C}$	保持时间/min	运行时间/min
0	50	1	1.0
25	220	0	7.8
3	230	18	35.0

气体流速: 氮气(载气): 30 mL/min, 氢气: 40 mL/min, 空气: 450 mL/min。进样量: 1 μ L, 分流比 50:1。由于使用的色谱柱与文献[34]中不同, 分析结果显示多个峰分离度欠缺, 且出峰不完全, 基线上飘严重(图 3), 难以判断 10 min 后脂肪酸甲酯中各脂肪酸对应的出峰时间。

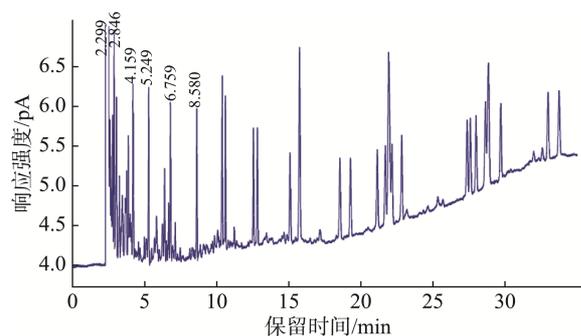


图 3 初始色谱条件脂肪酸甲酯气相图谱
Fig.3 Gas chromatogram of initial chromatographic conditions fatty acid methyl ester

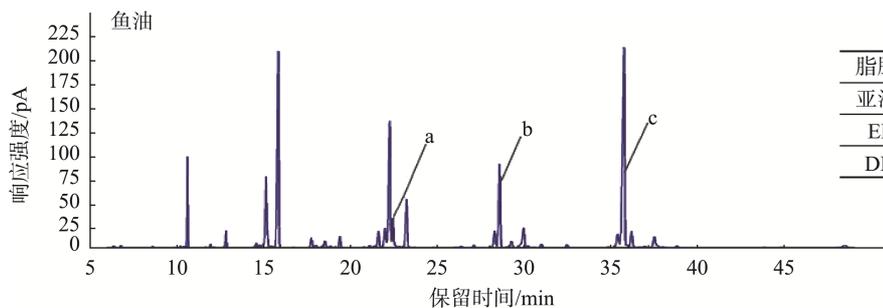
如图 3 所示, 在初始色谱条件下 10 min 后基线出现偏离, 原因可能为该时段升温速率过快, 对部分条件改进后, 色谱条件为: HP-5 毛细管色谱柱(0.32 mm \times 30 m, 0.25 μ m); 进样口温度 250 $^{\circ}$ C; 检测器温度 270 $^{\circ}$ C; 流动相为氮气; 流速: 1 mL/min; 色谱柱升温程序 2(表 10)。分析结果显示脂肪酸甲酯对照品在 0~60 min 内出峰正常, 且能准确定位到亚油酸、EPA 和 DHA 3 种不饱和脂肪酸(图 4)。

表 10 最优升温程序

Table 10 Optimal temperature program

速率/($^{\circ}$ C/min)	温度/ $^{\circ}$ C	保持时间/min	运行时间/min
0	160	5	5
5	190	5	16
2	230	20	56

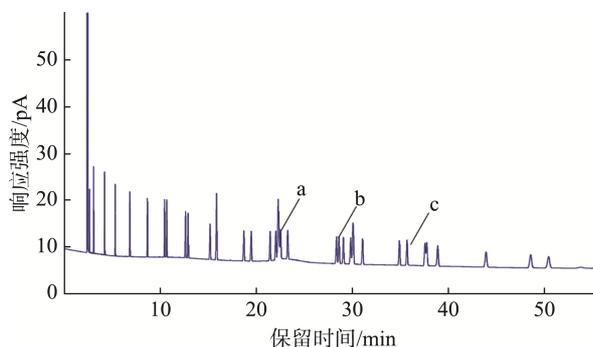
气体流速: 氮气(载气): 25 mL/min, 氢气: 30 mL/min, 空气: 400 mL/min。进样量: 1 μ L, 分流比 40:1。



注: a. 亚油酸; b. EPA; c. DHA。

图 5 各类油气相色谱图谱

Fig.5 Gas chromatograms of various oils



注: a. 亚油酸; b. EPA; c. DHA。

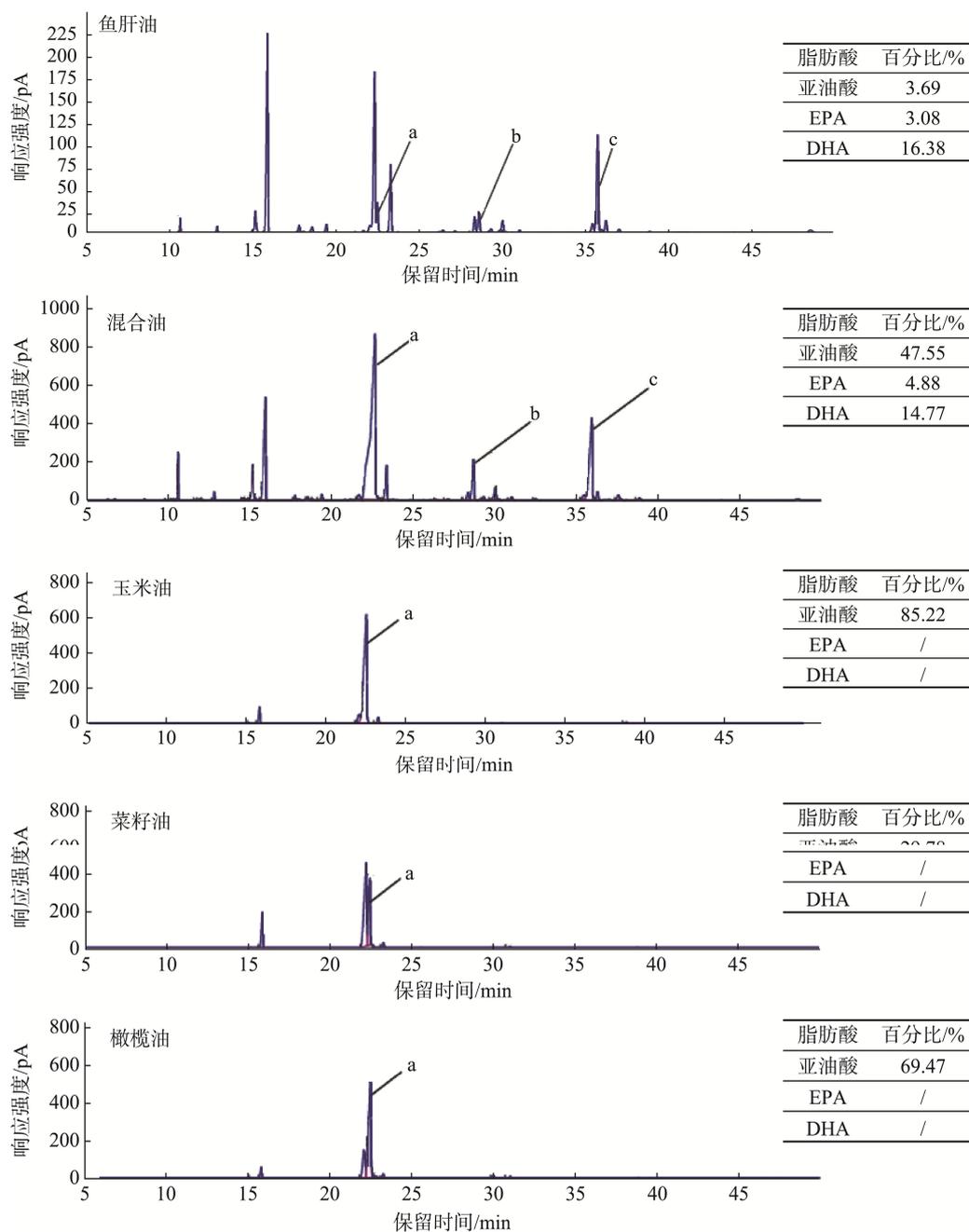
图 4 脂肪酸甲酯气相图谱

Fig.4 Gas chromatogram of chromatogram of fatty acid methyl ester

2.4 各类油中脂肪酸含量

实验主要分析各类油中亚油酸、EPA 和 DHA 含量。根据脂肪酸甲酯对照品的测定, 亚油酸出峰时间在 22.5 min 左右, EPA 出峰时间在 28.6 min 左右, DHA 出峰时间在 35.8 min 左右(图 4)。

鱼油中含有的主要不饱和脂肪酸有亚油酸、EPA 和 DHA, 其中 EPA、DHA 含量丰富, 占比大于亚油酸, 在总脂肪酸占比为 8.64%和 26.21%(图 5)。鱼肝油中主要脂肪酸与鱼油基本相同, 含有丰富的亚油酸、EPA 和 DHA, 其亚油酸含量占比略高于鱼油, EPA 和 DHA 占比相对鱼油较低, 在总脂肪酸占比为 3.08%和 16.38%。各类植物油中亚油酸含量丰富, 其中玉米油亚油酸占比 85.22%, 菜籽油亚油酸占比 29.78%, 橄榄油亚油酸占比 69.47%。3 种植物油中均未检测到 EPA 和 DHA 含量。混合油样品模拟添加了植物油后鱼肝油状态, 其中亚油酸占比 47.55%, EPA 和 DHA 占比分别为 4.88%和 14.77%。鱼油与植物油混合体积比为 9:1, 植物油的添加, 减少了鱼油中原有的 EPA 和 DHA 占比。由于植物油中含有大量的亚油酸及其他不饱和脂肪酸, 混合油中虽然只有 10%的体积比, 却导致 EPA 和 DHA 占比大幅下降。



注: a. 亚油酸; b. EPA; c. DHA; /表示未检出。

图 5(续) 各类油气相色谱图谱

Fig.5 Gas chromatograms of various oils

3 结论

紫外分光光度计法和高效液相色谱法(VA 醋酸酯法)不适用于鱼肝油 VA 含量测定。紫外分光光度计法可能更适用于单一结构的 VA 样品检测,药典高效液相法所定量的 VA 有效成分为 VA 醋酸酯,但实验结果显示天然鱼肝油中 VA 不以 VA 醋酸酯的形式存在。本研究建立的新方法通过皂化过程,将鱼肝油中的天然 VA 转化为视黄醇,通

过反相液相色谱系统测得其 VA 含量。通过方法学验证,该方法专属性、精密度高、回收率等符合要求,是一个通用的 VA 含量测定方法。

使用气相色谱系统在特定的色谱条件下,分别定位测定了鱼肝油、鱼油以及各类植物油和混合油中的亚油酸、EPA 和 DHA。鱼肝油、鱼油中 EPA、DHA 含量丰富,亚油酸含量少;玉米油、菜籽油、橄榄油中均不含 EPA 和 DHA,但亚油酸含量丰富。通过制定亚油酸、EPA 和 DHA

的比例限度,能够控制鱼肝油辅料的选择,且有效控制产品质量。

参考文献

- [1] KHALAF AT, WEI Y, ALNEAMAH SJA, *et al.* What is new in the preventive and therapeutic role of dairy products as nutraceuticals and functional foods [J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 1–9.
- [2] KUPPUSAMY P, YUSOFF MM, MANIAM GP, *et al.* Nutraceuticals as potential therapeutic agents for colon cancer: A review [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2014, 4(3): 173–181.
- [3] MIKOLASKOVA I, CRNOGORAC-JURCEVIC T, SMOLKOVA B, *et al.* Nutraceuticals as supportive therapeutic agents in diabetes and pancreatic ductal adenocarcinoma: A systematic review [J]. *Biology-Basel*, 2023, 12(2): 158.
- [4] MOSS JWE, WILLIAMS JO, RAMJI DP. Nutraceuticals as therapeutic agents for atherosclerosis [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 2018, 1864(5): 1562–1572.
- [5] FEHÉR J, KOVÁCS I, CORRADO BG. Cod liver oil. a natural vitamin d for preserving health [J]. *Orv Hetil*, 2011, 152(9): 323–330.
- [6] LOFTSSON T, ILIEVSKA B, ASGRIMSDOTTIR GM, *et al.* Fatty acids from marine lipids: Biological activity, formulation and stability [J]. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2016, 34: 71–75.
- [7] CHEN GX, WEISKIRCHEN S, WEISKIRCHEN R. Vitamin A: Too good to be bad? [J] *Frontiers in Pharmacology*, 2023, 14. DOI: 10.3389/fphar.2023.1186336
- [8] DEMAY MB, PITTAS AG, BIKLE DD, *et al.* Vitamin D for the prevention of disease: An endocrine society clinical practice guideline [J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2024, 109(8): 1907–1947.
- [9] GIAMPAZOLIAS E, DA-COSTA MP, LAM KC, *et al.* Vitamin D regulates microbiome-dependent cancer immunity [J]. *Science*, 2024, 384(6694): 428–437.
- [10] PÁL É, UNGVÁRI Z, BENYÓ Z, *et al.* Role of vitamin D deficiency in the pathogenesis of cardiovascular and cerebrovascular diseases [J]. *Nutrients*, 2023, 15(2): 334.
- [11] KAUR G, MASON RP, STEG PG, *et al.* Omega-3 fatty acids for cardiovascular event lowering [J]. *European Journal of Preventive Cardiology*, 2024, 31(8): 1005–1014.
- [12] FRAJERMAN A. Omega-3 and psychiatry: A narrative review [J]. *Annales Medico-Psychologiques*, 2024, 182(9): 799–805.
- [13] SUGASINI D, THOMAS R, YALAGALA PCR, *et al.* Dietary docosahexaenoic acid (DHA) as lysophosphatidylcholine, but not as free acid, enriches brain DHA and improves memory in adult mice [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11263.
- [14] LINDAY LA. Cod liver oil, young children, and upper respiratory tract infections [J]. *Journal of the American College of Nutrition*, 2010, 29(6): 559–562.
- [15] 吴礼邦, 何如怡, 虞恒, 等. 鲟鱼鱼油的酶法提取及对非酒精性脂肪肝病的干预作用[J]. *食品安全质量检测学报*, 2022, 13(11): 3532–3540. WU LB, HE RX, YU H, *et al.* Enzymatic extraction of sturgeon fish oil and its intervention on non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2022, 13(11): 3532–3540.
- [16] SAHU B, MAEDAA. Retinol dehydrogenases regulate vitamin A metabolism for visual function [J]. *Nutrients*, 2016, 8(11): 746.
- [17] BEIJER MR, KRAAL G, DEN-AAN JMM. Vitamin A and dendritic cell differentiation [J]. *Immunology*, 2014, 142(1): 39–45.
- [18] BONIFANT CM, SHEVILL E, CHANG AB. Vitamin A supplementation for cystic fibrosis [J]. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2014(5): CD006751.
- [19] CHA JH, YU QM, SEO JS. Vitamin A supplementation modifies the antioxidant system in rats [J]. *Nutrition Research and Practice*, 2016, 10(1): 26–32.
- [20] MAHASSNI S, AL-SHAikh N. Effects of vitamin A overdose on rat's organs involved in immunity and vitamin A storage [J]. *Acta Alimentaria*, 2014, 43(3): 452–458.
- [21] ZINDER R, COOLEY R, VLAD LG, *et al.* Vitamin A and wound healing [J]. *Nutrition in Clinical Practice*, 2019, 34(6): 839–849.
- [22] AZZINI E, FURINI T, POLITO A, *et al.* Vitamin nutritional status in patients with pancreatic cancer: A narrative review [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(9): 4773.
- [23] MAIA SB, ROLLAND-SOUZA AS, CAMINHA MDC, *et al.* Vitamin A and pregnancy: A narrative review [J]. *Nutrients*, 2019, 11(3): 681.
- [24] MATHEWS-ROTH MM. Lack of genotoxicity with beta-carotene [J]. *Toxicology Letters*, 1988, 41(3): 185–191.
- [25] MILLER RK, HENDRICKX AG, MILLS JL, *et al.* Periconceptional vitamin A use: How much is teratogenic? [J] *Reprod Toxicol*, 1998, 12(1): 75–88.
- [26] KELLING M, DIMZA M, BARTLETT A, *et al.* Omega-3 fatty acids in the treatment of heart failure [J]. *Current Problems in Cardiology*, 2024, 49(9): 102730.
- [27] MASON RP, SHERRATT SCR, ECKEL RH. Omega-3-fatty acids: Do they prevent cardiovascular disease? [J] *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2023, 37(3): 101681.
- [28] SEREFKO A, JACH ME, PIETRASZUK M, *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids in depression [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(16): 8675.
- [29] RUNDBLAD A, SANDOVAL V, HOLVEN KB, *et al.* Omega-3 fatty acids and individual variability in plasma triglyceride response: A mini-review [J]. *Redox Biology*, 2023, 63: 102730.
- [30] SINHA S, HAQUE M, LUGOVA H, *et al.* The effect of omega-3 fatty acids on insulin resistance [J]. *Life-Basel*, 2023, 13(6): 1322.
- [31] BHAT S, SARKAR S, ZAFFAR D, *et al.* Omega-3 fatty acids in cardiovascular disease and diabetes: A review of recent evidence [J]. *Current Cardiology Reports*, 2023, 25(2): 51–65.
- [32] HONG KM, HUN M, WU FF, *et al.* Association between omega-3 fatty acids and autoimmune disease: Evidence from the umbrella review and Mendelian randomization analysis [J]. *Autoimmunity Reviews*, 2024, 23(11): 103651.
- [33] ZIELINSKI O, VOB D, SAWORSKI B, *et al.* Computation of nitrate concentrations in turbid coastal waters using an *in situ* ultraviolet spectrophotometer [J]. *Journal of Sea Research*, 2011, 65(4): 456–460.
- [34] 王琼芬, 刘婷, 张梦奇, 等. 基于指纹图谱和化学计量分析的鳕鱼肝油软胶囊掺假植物油鉴定[J]. *食品安全质量检测学报*, 2019, 10(22): 7787–7792. WANG QF, LIU T, ZHANG MQ, *et al.* Identification of adulterated vegetable oil in cod liver oil soft capsule based on fingerprint and chemometrics analysis [J]. *Journal of Food Safety & Quality*, 2019, 10(22): 7787–7792.

(责任编辑:蔡世佳 于梦娇)