

鱼油中 EPA 和 DHA 含量的测定

靳智, 王友凯, 崔芳芳, 杨吉祥

青岛元信检测技术有限公司, 山东 青岛 266000

摘 要 : 建立了内标法测定鱼油中的二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA) 的分析方法。该方法对 GB 5009.168—2016《食品安全国家标准 食品中脂肪酸的测定》的前处理方法、仪器色谱条件分别进行了优化, 采用优化后的方法检测鱼油样品中 EPA 与 DHA 的含量, 通过3种定量方法重复性和测定结果的比较, 选出最佳定量分析方法。结果发现, 内标法重复性居中, 其测定结果与真实结果最接近, 偏差最小。

关 键 词 : 鱼油; EPA; DHA

Determination of EPA and DHA Content In Fish Oil

Jin Zhi, Wang Youkai, Cui Fangfang, Yang Jixiang

Qingdao Yuanxin Testing Technology Co., Ltd. Qingdao, Shandong 266000

Abstract : An internal standard method has been established for the analysis of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in fish oil. This method optimized the pre-treatment method and instrument chromatographic conditions of GB 5009.168–2016 "National Food Safety Standard for Determination of Fatty Acids in Foods". The optimized method was used to detect the content of EPA and DHA in fish oil samples. The best quantitative analysis method was selected by comparing the repeatability and measurement results of three quantitative methods. The results showed that the internal standard method had moderate repeatability, and its measurement results were closest to the true results with the smallest deviation.

Keywords : fish oil; EPA; DHA

鱼油是一种从多脂鱼类中提取的油脂, 因富含长链多不饱和脂肪酸, 有极其高的营养及临床价值, 其主要功效成分是二十碳五烯酸 (EPA) 和二十二碳六烯酸 (DHA)^[1]。科学研究发现, EPA 和 DHA 具有降低血小板凝聚率、减少血管收缩、优化血脂参数、改善视力、抗炎和免疫调节、抑制肿瘤生长、促进婴幼儿生长发育等功能, 可用于辅助治疗心脑血管疾病、改善记忆、延缓衰老以及增强人体免疫力^[2]。随着社会发展水平及大众认知水平的不断提高, 鱼油备受消费者青睐。鱼油作为保健食品的主要原料, 其含量高低影响了鱼油产品的质量; 鱼油作为食品提取物时, 其含量高低又影响了生产工艺的改进, 因此鱼油中 EPA 和 DHA 含量的检测结果将成为消费者和生产者的重要判断依据。

目前 GB 28404–2012 食品安全国家标准是检测保健食品中二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸含量的主要依据, SN/T 2922–2022 是出口保健食品中 EPA 和 DHA 检测的主要依据。鱼油作为食品提取物时, 则主要依据食品中脂肪酸的测定 GB 5009.168–2016, 该标准采用气相色谱法, 包括内标法、外标法和归一化法三个定量方法。但 GB 5009.168—2016 是针对食品中所有脂肪酸而制定的方法, 其前处理方法和色谱测定方法耗时长, 效率低, 而且对鱼油的准确定量方法也未作出明确规定。

本研究将对 GB 5009.168–2016 中前处理方法和仪器测定条件进行优化, 采用优化后的方法测定鱼油中 EPA 和 DHA, 用3种方法分别进行定量, 通过测定结果和方法重复性的比较, 选出适合鱼油中 EPA 和 DHA 含量测定的一种分析方法, 达到降低检测成本, 提高检测效率和准确度的效果, 为生产者工艺改进提供了依据。

一、材料与方法

(一) 仪器与试剂

Agilent7890B 气相色谱仪; SHA-BA 数显水浴恒温振荡器; FM-40 低速离心机; BSM-220.3 千分位电子天平。

14%三氟化硼甲醇溶液; 氢氧化钠、氯化钠均为分析纯; 正庚烷、甲醇均为色谱纯;

37种脂肪酸甲酯混合标准溶液, 十一碳酸甘油三酯, 二十碳五烯酸甲酯, 二十二碳六烯酸甲酯均购于北京曼哈格生物科技有限公司; 实验用鱼油由生产厂家提供。

（二）实验方法

1. 标准溶液配制

称取一定量的十一碳酸甘油三酯,用甲醇定容至10mL,配成9666 mg/L的内标溶液,冷藏保存1个月。称取一定量的二十碳五烯酸甲酯和二十二碳六烯酸甲酯用正庚烷定容至10mL,配成500 mg/L的混合标准溶液,于-10℃以下保存,有效期3个月。取出适量37种脂肪酸甲酯混合标准溶液至10mL容量瓶中,用正庚烷稀释定容配成1000mg/L,贮存于-10℃以下冰箱,有效期3个月。

2. 气相色谱条件

a) 毛细管色谱柱: 聚二氰丙基硅氧烷强极性固定相, 柱长100m, 内径0.25mm, 膜厚0.2μm。

b) 进样器温度: 250℃

c) 检测器温度: 280℃

d) 程序升温: 100℃保持2min, 以5℃/min的升温速率升温至200℃, 保持10min; 以2℃/min升至220℃, 保持15min。

e) 载气: 氮气

f) 分流比: 20 : 1

g) 进样体积: 1.0μL

3. 样品前处理

称取混合均匀的试样0.1g(精确至0.001g)于50mL圆底离心管中,加入9666 mg/L的内标物十一碳酸甘油三酯0.517mL,加入一定体积的2%氢氧化钠甲醇溶液(因素1),于80℃水浴震荡30min,至油滴消失,加入一定体积的14%三氟化硼甲醇溶液(因素2),于80℃水浴震荡5min,停止加热,冷却至室温后,加入一定体积的正庚烷(因素3),振荡2min,加入5mL饱和氯化钠静置分层后,吸取上层正庚烷提取溶液大约2mL,至10mL试管中,加入大约2g无水硫酸钠,振摇1min,2000r/min离心5min,取上清液过有机滤膜到进样瓶中,待气相色谱分析。

4. 不同定量方法的重复性

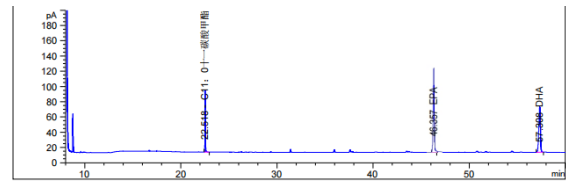
按照优化后的仪器条件和前处理条件,称取6份鱼油试样0.1g(精确至0.001g)平行处理并进行测定,分别用3种定量方法测定,以6次测定结果的相对标准偏差(RSD)表示方法的重复性。

二、结果与分析

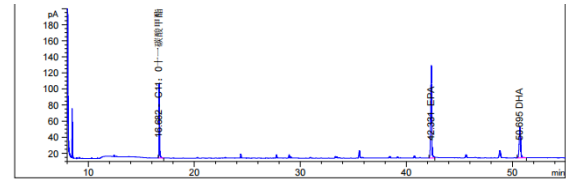
（一）仪器条件优化

表1 仪器条件优化前后保留时间

序号	项目名称	优化前保留时间/min	优化后保留时间/min
1	C11:0 十一碳酸甲酯	22.518	16.682
2	C20:5n3 顺-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸甲酯	46.357	42.331
3	C22:6n3 顺-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸甲酯	57.308	50.695



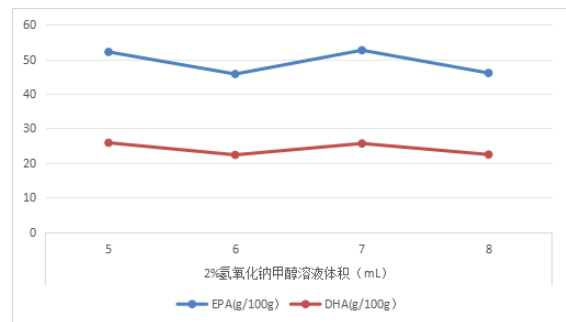
>图2 优化前样品谱图



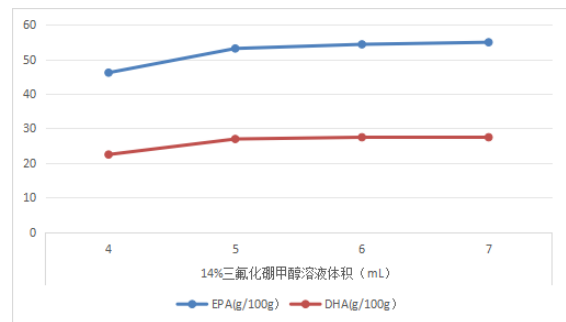
>图3 优化后样品谱图

按照GB 5009.168-2016仪器参考条件,GC采集时间为85min,仪器条件优化后GC采集时间为57min,缩短了28min,显著提高了检测效率。从表1、图2和图3可以看出,仪器条件优化后,目标化合物保留时间明显缩短,样品峰保留时间由46.357min和57.308 min 分别提前至42.334min和50.695 min。

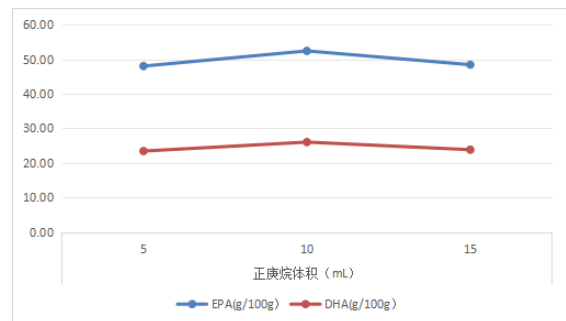
（二）前处理条件优化



>图3 因素1对EPA和DHA检测结果的影响



>图4 因素2对EPA和DHA检测结果的影响



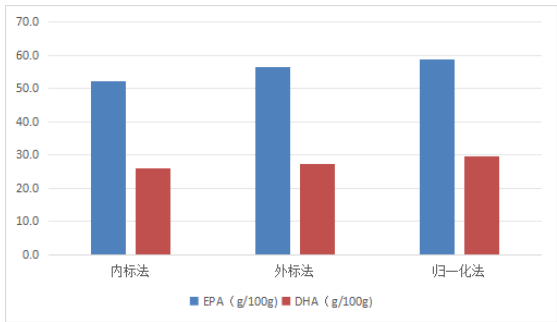
>图5 因素3对EPA和DHA检测结果的影响

为满足不同食品水解和提取的需要, GB 5009.168—2016 前处理过程中使用 250 mL 平底烧瓶为容器, 溶液易受热不均匀, 而鱼油不经过水解提取就可直接进行皂化和甲酯化, 所需试剂较少^[3]。本实验将250 mL 平底烧瓶改为 50 mL 圆底离心管, 提高了溶液均匀度, 缩短了加热时间。GB 5009.168—2016使用回流冷凝器进行水浴回流, 本研究改成恒温水浴震荡加热, 操作简单, 经实验验证, 结果无差别。

对3个影响因素采用单因素变量依次进行实验, 因素1体积分别是5mL、6mL、7mL、8mL, 因素2体积分别是4mL、5mL、6mL、7mL, 因素3体积分别是5mL、10mL、15mL。采用内标法定量, 考察各因素水平对检测结果的影响。

从图3可以看出, 当2%氢氧化钠甲醇溶液体积为5mL和7mL时, EPA和DHA含量最高, 且偏差较小, 从节约资源角度考虑, 选择2%氢氧化钠甲醇溶液的体积为5mL。从图4可以看出, 随着14%三氟化硼甲醇溶液体积的增加, EPA和DHA含量呈上升趋势, 当14%三氟化硼甲醇溶液体积为6mL时, 随着其体积的增加, EPA和DHA含量的变化已不明显, 所以选择14%三氟化硼甲醇溶液的体积为6mL。从图5可以看出, 当正庚烷体积为10mL时, EPA和DHA含量最高。

(三) 不同定量方法的检测结果及重复性



>图 6 不同定量方法的检测结果

表2 不同定量方法的精密度

定量方法	RSD% (EPA)	RSD% (DHA)
内标法	0.78	1.23
外标法	3.56	5.97
归一化法	0.18	0.21

本实验取100mg/L的EPA和DHA混合标准溶液, 加入100mg/L的十一碳酸甲酯混匀后进行测定, 获得内标法中EPA的响应因子为0.9534, DHA的响应因子为0.9667。取EPA和DHA混合标准系列溶液为5、10、20、50、100 mg/L分别进行测定, 以目标物峰面积为Y轴, 以目标物的质量浓度为X轴, 绘制标准曲线, 获得EPA的曲线方程 $Y=0.2774X-0.0657$, 线性相关系数 $r^2=0.9974$, DHA的曲线方程 $Y=0.1348X-0.0296$, 线性相关系数 $r^2=0.9976$ 。

从图6可以看出, 用内标法测定的鱼油中EPA和DHA的含量最低, 归一化法最高。从表2可知, 3个定量方法中, 外标法的精密度最大, 说明方法的稳定性最差, 归一化法的精密度最小, 稳定性最好, 该方法受前处理过程的影响较小。根据生产厂家提供的EPA和DHA的数值, 发现内标法测定的结果最接近, EPA相对偏差为1.94%, DHA相对偏差为1.16%。

三、结论

本研究对国标 GB 5009.168—2016 中的脂肪的皂化和脂肪酸的甲酯化前处理方法和仪器条件进行优化, 以提高该方法的检测效率和准确度, 为鱼油的检测提供参考。采用优化后的检测方法测定鱼油中EPA和DHA的含量, GB 5009.168—2016中3个定量方法分析结果存在明显差异, 说明不同类型的食品, 其脂肪酸的测定有其适合的定量方法。以此为契机, 建议国家标准 GB 5009.168—2016修订时, 方法适用的基质类型具体化, 满足市场检测快速发展的需求。

参考文献

[1] DYERBERG J. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis [J]. Lancet, 1978, 312(8081): 117 - 119.
[2]陈彦婕, 唐嘉诚, 宫萱, 等. 鱼油提取, 多不饱和脂肪酸富集及 EPA 和 DHA 的应用研究进展 [J]. 食品与机械, 2021, 37(11): 205 - 210, 220.
[3]朱丽君, 王鲁霞, 孟令军, 等. 气相色谱法测定鱼油中的二十碳五烯酸和二十二碳六烯酸及其品质评价 [J]. 实验室检测, 2023, 1(4): 13 - 20.