

保健食品中 α -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

金迁

(浙江福立分析仪器股份有限公司, 浙江 温岭 317500)

摘要: 试样经酸水解后提取脂肪, 其中 α -亚麻酸、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳五烯酸 (DPA)、二十二碳六烯酸 (DHA) 经酯交换生成甲酯后, 通过气相色谱分离检测, 以保留时间定性, 外标法定量。

关键词: 气相色谱; 脂肪酸; 检测

1 检测方法

GB 28404—2012《食品安全国家标准保健食品中 α -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》

2 试剂和材料

2.1 试剂

- 1) 氢氧化钾 (KOH)。
- 2) 盐酸 (HCl)。
- 3) 无水乙醚 ($C_2H_5OC_2H_5$)。
- 4) 乙醇 (CH_3CH_2OH): 体积分数 $\geq 95\%$ 。
- 5) 石油醚: 沸程 $30^\circ C \sim 60^\circ C$ 。
- 6) 正己烷 ($CH_3(CH_2)_4CH_3$): 色谱纯。
- 7) 甲醇 (CH_3OH): 色谱纯。
- 8) 无水硫酸钠 (Na_2SO_4)

2.2 试剂配制

氢氧化钾甲醇溶液 (0.5 mol/L): 称取 2.8 g 氢氧化钾, 用甲醇溶解并定容至 100 mL, 混匀。

2.3 标准品

- 1) α -亚麻酸甲酯 ($C_{19}H_{32}O_2$): 浓度: 10mg/mL 溶于庚烷
- 2) EPA 甲酯 ($C_{21}H_{32}O_2$): 浓度: 10mg/mL 溶于庚烷

- 3) DPA 甲酯($C_{23}H_{36}O_2$): 纯度 $\geq 98.0\%$ 。
- 4) DHA 甲酯($C_{23}H_{34}O_2$): 浓度: 10mg/mL 溶于庚烷

2.4 标准溶液配制

- 1) DPA 甲酯标准储备溶液 (10.0mg/mL): 准确称取 50mg (3.3.3) 至 5mL 正庚烷溶液中, 加盖摇匀, 备用。
- 2) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准储备溶液 (1mg/mL): 用微量注射器分别吸取 100ul (3.3.1、3.3.2、3.3.4、4.1.1) 至 600uL 正己烷中, 加盖摇匀, 备用。
- 3) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准溶液 (0.4mg/mL): 用微量注射器吸取 400ul (4.1.2) 至 600uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。
- 4) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准溶液 (0.2mg/mL): 用微量注射器吸取 500ul (4.1.3) 至 500uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。
- 5) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准溶液 (0.1mg/mL): 用微量注射器吸取 500ul (4.1.4) 至 500uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。
- 6) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准溶液 (0.08mg/mL): 用微量注射器吸取 100ul (4.1.3) 至 400uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。
- 7) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标标准溶液 (0.04mg/mL): 用微量注射器吸取 400ul (4.1.5) 至 600uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。
- 8) α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯和 DHA 甲酯 4 种混标最低检出溶液 (0.01mg/mL): 用微量注射器吸取 250ul (4.1.7) 至 750uL 正己烷中, 加盖摇匀, 待测。

2.5 供试品溶液的制备

按照《GB 28404—2012 食品安全国家标准保健食品中 α -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》中 (5.1.1-5.1.2) 制备供试品溶液。

2.6 使用仪器设备

- 1) GC9720 气相色谱仪, 附氢火焰检测器 (FID)
- 2) FL1090B 自动进样器 (选配)
- 3) HP- INNOWAX/30m*0.32mm*0.5um 毛细柱
- 4) 分析天平: 感量为 1 mg 和 0.1mg
- 5) 旋转蒸发器。
- 6) 离心机: 转速 ≥ 4000 r/min。

- 7) 涡旋混合器。
- 8) 恒温水浴锅。

3 测定

3.1 色谱条件

1) 色谱柱:

HP- INNOWAX 石英毛细管柱, 柱长 30m, 内径 0.32mm, 膜厚 0.5um

2) 升温程序: 初温 110°C, 保持 1min, 以 20°C/min 升到 230°C, 保持 13min。

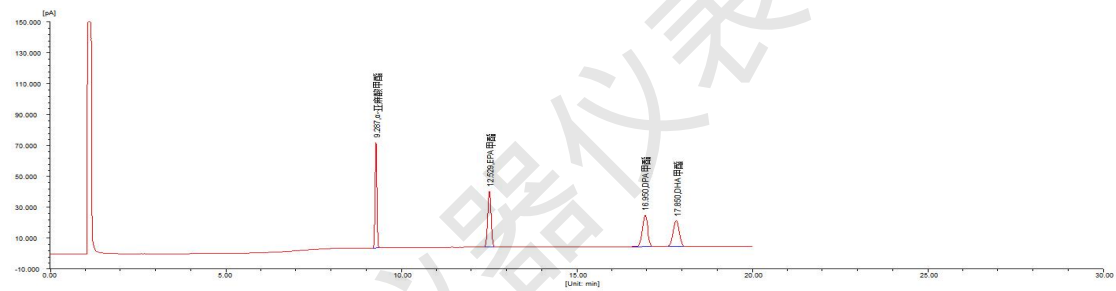
3) 检测器温度: 240°C

4) 进样口温度: 280°C; 进样量: 1.0 uL; 分流比 10 : 1

5) 载气流量 (N₂): 2.0mL/min

6) 氢气: 30 mL/min; 空气 300 mL/min; 尾吹 30 mL/min

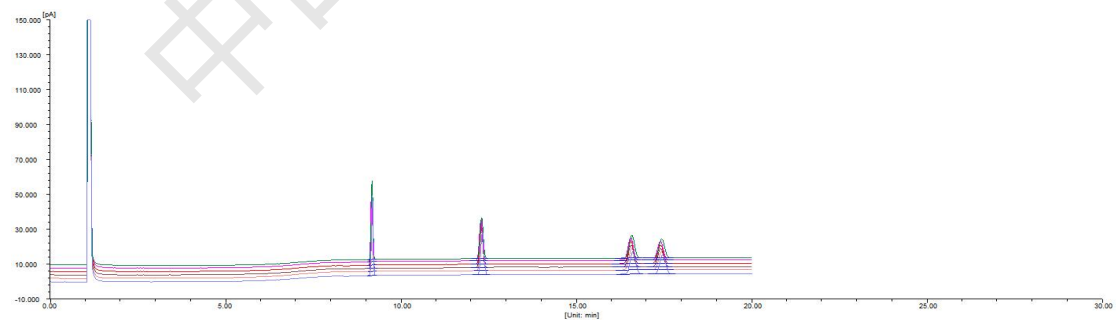
3.2 典型谱图



1—— α -亚麻酸甲酯; 2——EPA 甲酯; 3——DPA 甲酯; 4——DHA 甲酯;

图 1 200mg/mL α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯、DHA 甲酯标准溶液色谱图

3.3 重复性实验 (0.04 mg/mL)

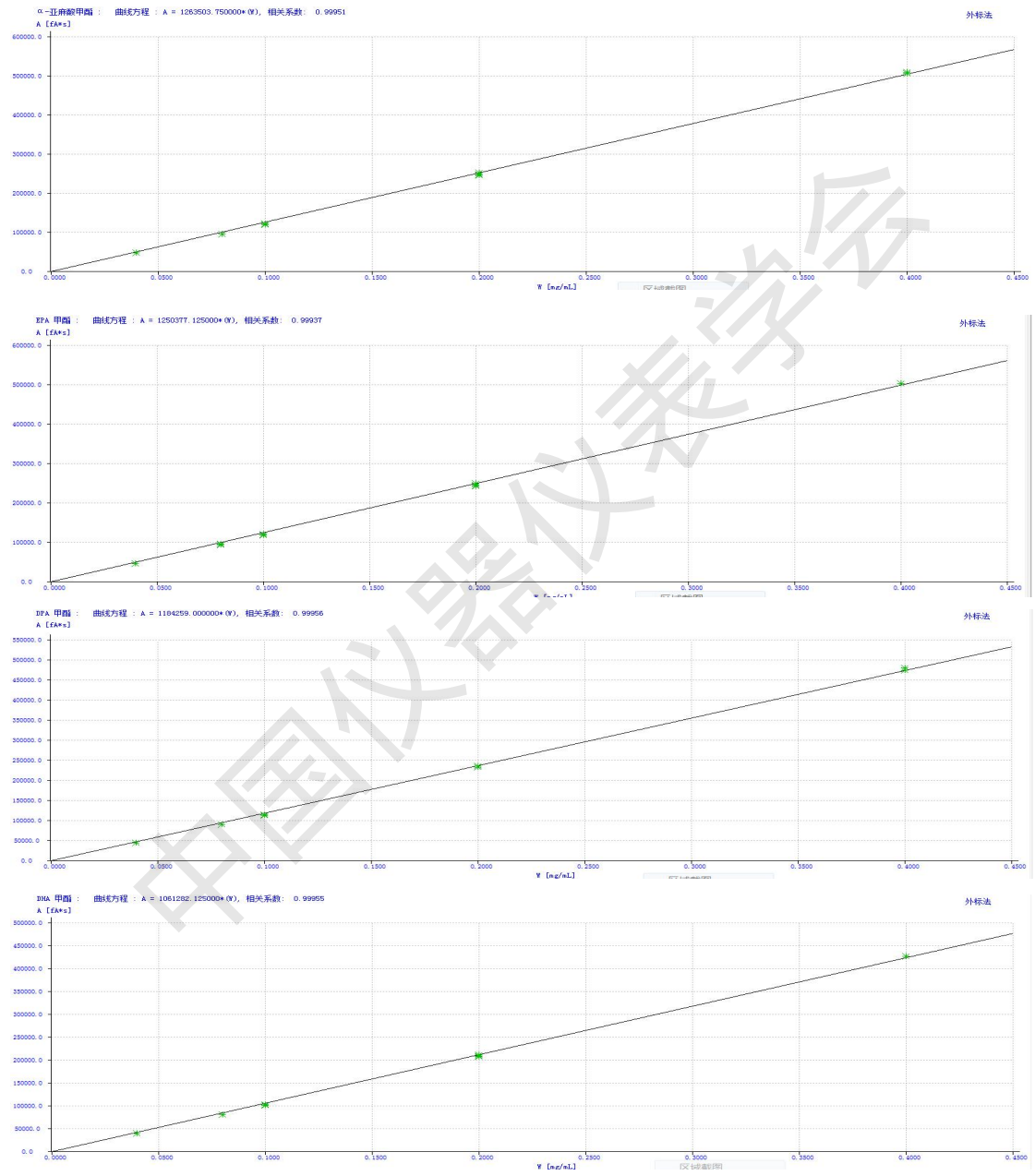


序号	组分名	平均时间	时间RSD%	平均面积	面积RSD%	平均峰高	峰高RSD%	平均含量	含量RSD%	谱图数
1	α -亚麻酸甲酯	9.182	0.075	157784.5	2.0462	44416.4	2.6449	26.7257	0.1722	6
2	EPA 甲酯	12.316	0.117	154215.6	2.1184	23492.2	2.5167	26.1208	0.1123	6
3	DPA 甲酯	16.580	0.147	147197.6	2.1266	13117.1	2.1469	24.9321	0.1806	6
4	DHA 甲酯	17.446	0.161	131192.7	2.1039	10984.1	2.1479	22.2213	0.1804	6

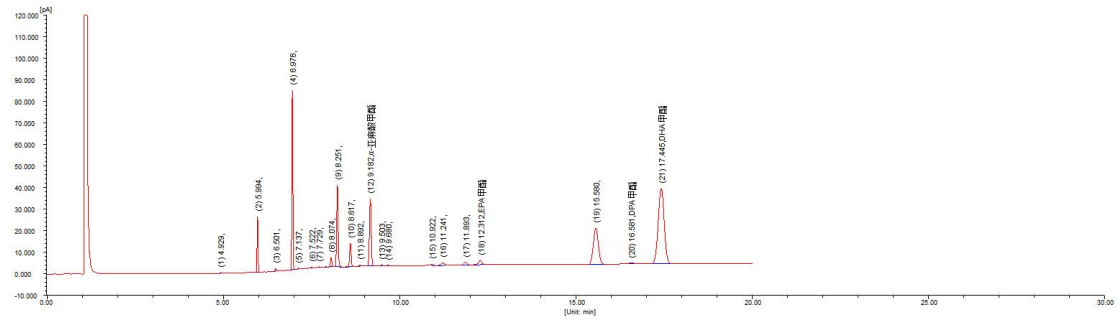
图 2 100mg/mL α -亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯、DHA 甲酯标准溶液重复性谱图及结果

3.4 校正曲线及相关系数

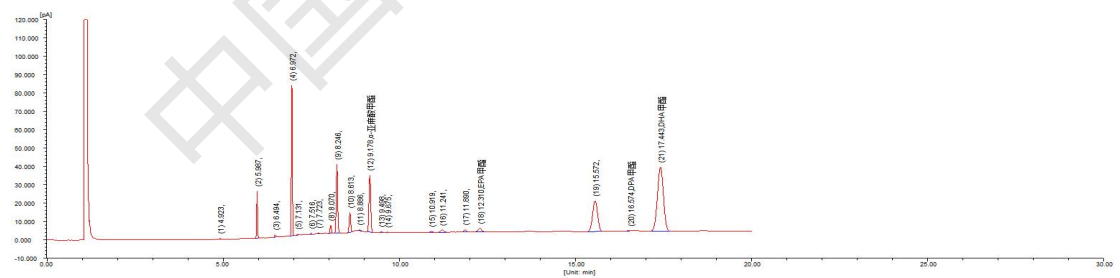
序号	组分名	保留时间[min]	曲线方程	相关系数 r^2
1	α -亚麻酸甲酯	9.287	$A=1263503.750*(W)$	0.99951
2	EPA 甲酯	12.529	$A=1250377.125*(W)$	0.99937
3	DPA 甲酯	16.950	$A=1184259.000*(W)$	0.99956
4	DHA 甲酯	17.850	$A=1061282.125*(W)$	0.99955



3.5 样品典型谱图及分析结果



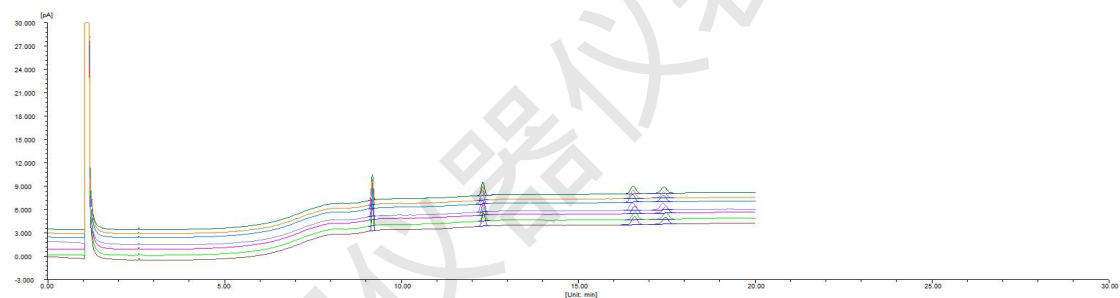
峰序	组分名	保留时间[min]	半峰宽[min]	峰高[aU]	峰面积[aU*s]	峰面积[%]	含量[mg/g]	
1		4.929	0.029	652.6	1194.4	0.0000	0.0000	
2		5.994	0.029	25975.7	48247.1	0.0000	0.0000	
3		6.501	0.041	1459.8	3664.2	0.0000	0.0000	
4		6.978	0.030	83564.2	161390.4	0.0000	0.0000	
峰序	组分名	保留时间[min]	半峰宽[min]	峰高[aU]	峰面积[aU*s]	峰面积[%]	含量[mg/g]	
5		7.137	0.049	720.3	2098.6	0.0000	0.0000	
6		7.522	0.037	747.7	2156.9	0.0000	0.0000	
7		7.729	0.036	573.4	1305.9	0.0000	0.0000	
8		8.074	0.043	4478.5	13454.2	0.0000	0.0000	
9		8.251	0.044	38184.1	110790.9	0.0000	0.0000	
10		8.617	0.048	11071.3	34240.3	0.0000	0.0000	
11		8.892	0.052	716.4	2321.0	0.0000	0.0000	
12	α-亚麻酸甲酯	9.182	0.055	31302.6	110440.2	20.3006	85.3593	
13		9.503	0.060	751.6	2843.1	0.0000	0.0000	
14		9.680	0.071	293.2	1359.7	0.0000	0.0000	
15		10.922	0.081	695.9	3501.7	0.0000	0.0000	
16		11.241	0.117	1308.3	9456.3	0.0000	0.0000	
17		11.893	0.097	1304.4	8107.6	0.0000	0.0000	
18	EPA 甲酯	12.312	0.109	2060.0	15376.3	2.8264	12.0091	
19		15.580	0.156	16927.9	169491.2	0.0000	0.0000	
20	DPA 甲酯	16.581	0.139	252.1	2091.5	0.3844	1.7247	
21	DHA 甲酯	17.445	0.184	35109.9	416117.8	76.4886	382.9001	
				总计:	258149.8	1119649.2	100.0000	481.9932



峰序	组分名	保留时间[min]	半峰宽[min]	峰高[fA]	峰面积[fA*s]	峰面积[%]	含量[mg/g]	
1		4.923	0.029	646.6	1187.7	0.0000	0.0000	
2		5.987	0.029	25890.9	48319.1	0.0000	0.0000	
3		6.494	0.042	1457.0	3738.5	0.0000	0.0000	
4		6.972	0.031	82129.6	160685.9	0.0000	0.0000	
5		7.131	0.050	726.7	2152.2	0.0000	0.0000	
6		7.516	0.037	753.8	2164.6	0.0000	0.0000	
7		7.723	0.037	595.3	1398.6	0.0000	0.0000	
8		8.070	0.043	4427.0	12073.8	0.0000	0.0000	
9		8.246	0.045	37708.6	110091.1	0.0000	0.0000	
10		8.613	0.048	10827.5	33213.6	0.0000	0.0000	
11		8.886	0.053	740.8	2537.6	0.0000	0.0000	
12	α-亚麻酸甲酯	9.178	0.055	31109.7	110015.7	20.2208	85.0312	
13		9.498	0.060	748.3	2824.7	0.0000	0.0000	
14		9.675	0.066	254.4	1114.1	0.0000	0.0000	
15		10.919	0.080	693.7	3499.0	0.0000	0.0000	
16		11.241	0.117	1299.5	9541.0	0.0000	0.0000	
17		11.890	0.098	1301.9	8356.8	0.0000	0.0000	
18	EPA 甲酯	12.310	0.108	2095.7	15601.2	2.8675	12.1847	
19		15.572	0.156	16830.2	169566.4	0.0000	0.0000	
20	DPA 甲酯	16.574	0.144	246.7	2100.0	0.3860	1.7317	
21	DHA 甲酯	17.443	0.186	35036.2	416354.1	76.5257	383.1176	
				总计:	255520.1	1116535.8	100.0000	482.0652

以上获得的两次独立测定结果的绝对差值均不超过算术平均值的 10%。

3.6 最低检出限 (0.01mg/mL)




序号	组分名	平均时间	时间RSD%	平均面积	面积RSD%	平均峰高	峰高RSD%	平均含量	含量RSD%	谱图数
1	α-亚麻酸甲酯	9.186	0.108	12195.7	0.8726	3352.8	1.2940	0.0097	0.8726	7
2	EPA 甲酯	12.322	0.145	11917.3	1.4241	1787.6	0.9256	0.0095	1.4241	7
3	DPA 甲酯	16.586	0.199	11401.4	1.4849	1016.4	0.8339	0.0096	1.4849	7
4	DHA 甲酯	17.453	0.203	10636.4	1.6568	858.6	0.9756	0.0100	1.6568	7

图 3 0.01mg/mL α-亚麻酸甲酯、EPA 甲酯、DPA 甲酯、DHA 甲酯标准溶液重复性谱图及结果

在称样量为 0.0512g，定容体积为 5 mL，此方法的检出限及测定下限见下表：

组分名	标液浓度 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	含量 mg/mL	MDL mg/mL	检出限 g/100g	测定下限 g/100g	标准中 检出限 g/100g
α-亚麻酸甲酯	0.01	0.0095	0.0097	0.0096	0.0096	0.0097	0.0097	0.0097	0.0002	0.0024	0.0097	0.010
EPA 甲酯	0.01	0.0094	0.0096	0.0095	0.0097	0.0094	0.0095	0.0097	0.0004	0.0039	0.0156	0.018
DPA 甲酯	0.01	0.0098	0.0096	0.0095	0.0096	0.0095	0.0096	0.0099	0.0005	0.0046	0.0186	0.024
DHA 甲酯	0.01	0.0098	0.01	0.0099	0.0101	0.01	0.0101	0.0103	0.0005	0.0049	0.0197	0.018

八、色谱配置及主要试剂耗材清单

分析项目		微量分析	
主机配置		控温范围：室温加 5°C~450°C, (以 0.1°C增量任设)	
	GC9720	程序升温速率：0-120°C/min	
	氢火焰离子化检测器 FID (含板)	程序升温 30 阶	
	毛细进样系统	快速降温：250~100°C≤1.5 分钟	
	压力、流量传感器	温度稳定性：±0.1°C	
辅助进样系统	自动进样器 (选配)	最高使用温度：450°C 温控精度：±0.1°C	
	色谱柱	灵敏度≤3.0×10 ⁻¹² g/s[正十六烷]	1 套
色谱柱	反控工作站	自动点火	
	气源	分流/不分流模式	1 套
净化器	载气	压力控制范围：0-90psi	
	燃气	程序升压 8 阶	
其他	助燃气	流量控制范围：0-600ml/min	
	气体净化器	程序升流 8 阶	
易耗品	电脑、打印机	FL1090B 自动进样器	1 套
	稳压电源	聚乙二醇 20000 (30m×0.32mm×0.5um)	1 根
试剂与材料	备件包	FL9720 色谱工作站	1 套
	α-亚麻酸甲酯(C ₁₉ H ₃₂ O ₂)	高纯钢瓶氮气+减压阀 (钢瓶气用户自备)	1 套
	EPA 甲酯(C ₂₁ H ₃₂ O ₂)	高纯钢瓶氢气+减压阀/氢气发生器 (钢瓶气用户自备)	1 套
	DPA 甲酯(C ₂₃ H ₃₆ O ₂)	无油空气发生器	1 台
	DHA 甲酯(C ₂₃ H ₃₄ O ₂)	GPI-2 气体净化器, 用于净化气体	1 套
	正己烷	电脑带 232 串口端口、网线端口, 操作系统详见安装环境说明	1 套
	正庚烷	电压: 220V±22V (不满足条件的用户必配), 功率≥2500W	1 台
	丙酮	免费提供安装调试所有备件、半年期易耗品	1 套
	分析天平	浓度: 10 mg/mL 溶于庚烷	1 套
	离心机	浓度: 10 mg/mL 溶于庚烷	1 套
旋转蒸发仪	纯度≥98.0%(建议购买浓度及溶剂与其它单标相同的溶液)	1 套	
涡旋振荡器	浓度: 10 mg/mL 溶于庚烷	1 套	
恒温水浴锅	分析纯	1 套	
	分析纯	1 套	
	色谱纯	1 套	
	感量 1mg 和 0.1mg	各 1 套	
	转速≥4000 r/min	1 套	
		1 套	
		1 套	
		1 套	