

气相色谱法检测 2 种 ω -3 脂肪酸含量

汪素芳, 曹莹, 董淮晋, 冯学良

(中国环境科学研究院环境检测与实验中心, 北京 100012)

摘要: 建立甲酯化-气相色谱法同时检测二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)含量的分析方法。样品经二氯甲烷提取后, 与 0.5%硫酸-甲醇 溶液在 60 °C条件下反应 30 min, 反应液使用硅酸镁柱层析净化。将洗脱液转移至 15 mL 离心管中, 2000 r/min 离心 20 min, 上清液氮吹浓缩后, 用乙腈定容至 1 mL, 使用气相色谱分离, 火焰离子化检测器检测, 外标法定量。方法在 0.02~2.00 mg/mL 的线性范围内, 相关系数为 0.9999。平行样品的相对标准偏差不超过 6% (n=3), 平均回收率大于 82.6%。该方法简便高效、检出限低、重现性好, 可用于新鲜和干燥南极磷虾样品中 EPA 和 DHA 的检测。

关键词: 南极磷虾; 二十碳五烯酸; 二十二碳六烯酸; 气相色谱法; 酯化

Simultaneous determination of 2 kinds of ω -3 fatty acids by gas chromatography

WANG Su-Fang, CAO Ying, DONG Huai-Jin, FENG Xue-Liang

(The Environment Analysis and Testing Laboratory, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China)

Abstract: Objective To establish an analytical method for the simultaneous determination of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in *Euphausia superba* by methyl esterification-gas chromatography. The samples were extracted with dichloromethane, and reacted with 0.5% sulfuric acid-methanol solution at 60°C for 30 min, the reaction solution was purified by magnesium silicate column chromatography. Subsequently, the eluate was transferred to a 15 mL centrifuge tube, and centrifuged at 2000 r/min for 20 min, the upper solution was concentrated by blowing nitrogen, and the solution was diluted with acetonitrile to a final volume of 1 mL, then, the obtained sample was separated using a DB-1701 chromatographic column (30 m×0.32 mm, 1.00 μ m), and then detected by a flame ionization detector, and quantified by an external standard method. Results The method had good linear correlations within the concentration range of

0.02-2.00 mg/mL with correlation coefficients were 0.9999. The relative standard deviations of parallel samples were no more than 6% (n=3), and the average recoveries were greater than 82.6%. Conclusion This method is simple and efficient, with low detection limit and good reproducibility, it can be suitable for the determination of EPA and DHA in fresh and freeze-dried Euphausia superb.

南极磷虾是南冰洋储备丰富的小型浮游类甲壳动物,是南极水域海洋生物食物链的关键环节^[1]。南极磷虾富含人体必需氨基酸、不饱和脂肪酸及虾青素等物质,营养价值高,用途广泛^[2]。因其广阔的应用前景,南极磷虾已经成为食品保健、检测分析、饲料营养等学科的研究热点之一^[3-5]。研究显示,南极磷虾脂质中含有 ω -3 系列多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids, PUFA), 包括含量相对较高的二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid, EPA)和二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid, DHA)^[6-7]。作为人体必需的不饱和脂肪酸, EPA 和DHA 具有调节血脂、软化血管、促进生长发育和增强人体免疫等功能,对预防和治疗心脑血管、糖尿病、哮喘、慢性阻塞性肺病和癌症等疾病起到重要作用^[8]。当前,EPA 和 DHA 的市场来源主要是鱼油,但市售鱼油的质量良莠不齐,有效成分含量差异大,且部分鱼油被检测到农药和重金属残留,给人体健康带来较大危害^[9-11]。

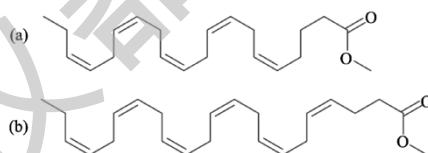


图1 EPA 甲酯(a)和 DHA 甲酯(b)的结构式
Fig.1 Chemical structures of EPA methyl ester (a) and DHA methyl ester (b)

1 材料与方法

1.1 试剂与样品

甲醇、二氯甲烷、乙腈、正己烷(色谱纯); 95%硫酸(超纯级); EPA、DHA 及其甲酯标准品(纯度98%); 3,5-二特丁基-4- 羟基甲苯 (分析纯); 硅酸镁小柱(1000 mg, 6 mL); 新鲜和干燥的南极磷虾均购自山东科芮尔生物制品有限公司。

1.2 仪器与设备

GC-6100 气相色谱仪[配火焰离子化检测器, 江苏天瑞仪器股份有限公司]; 色谱柱 [DB-1701), 安捷伦科技有限公司]; MG 600H 磁力搅拌器; D-37520 Osterode 高速冷冻离心机; DHG-9140A 立式恒温干燥箱; XSR205DU/A 电子分析天平; Milli-Q IQ 7000 纯水系

统;。

1.3 标准曲线绘制

抗氧化剂BHT 在EPA、DHA 及其相应甲酯溶液中的质量分数均为0.01%; EPA 甲酯和DHA 甲酯同时溶解于乙腈中, 配制成质量浓度为5.0 mg/mL 的混合标准溶液, 实验中所需EPA 甲酯和DHA 甲酯混合标准溶液由上述母液稀释至相应浓度; 配制成质量浓度为0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL 7 个标准系列浓度进行气相色谱检测。以标准系列溶液中目标物浓度为横坐标(X, mg/mL), 以其对应的峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线。

1.4 实验方法

1.4.1 EPA和DHA混合标准溶液甲酯化条件将EPA 和DHA 的标准混合液(1.0 mL, 1.0 mg/mL)加入至10.0 mL 烧瓶中, 将浓硫酸溶解到甲醇(2 mL)中, 冰浴条件下, 将硫酸-甲醇溶液缓慢滴入烧瓶中使用磁力搅拌器使其充分混合。反应瓶上方加球型回流管, N₂ 保护下进行加热搅拌, 反应结束后冷却至室温, 将反应液转移至硅酸镁小柱, 分别用5 mL 甲醇、5 mL 正己烷充分洗脱甲酯化产物。将洗脱液转移至15 mL 离心管中, 转速为2000 r/min、温度为5 °C离心20 min, 用吸管吸取离心管上层溶液, 氮吹至近干, 用乙腈定容至1 mL 保存在样品瓶中,-20 °C冷冻备用。通过控制不同的浓硫酸加入量、反应温度和反应时间, 前处理产物使用气相色谱检测, 探讨EPA和DHA 最优甲酯化条件。

1.4.2 萃取液EPA 和DHA 甲酯化条件: 将磷虾索提提取液浓缩至1 mL, 按照1.4.2 实验步骤进行前处理反应, 为了使磷虾提取液中目标物完全与甲醇反应, 使用0.5% (V:V)硫酸作为催化剂, 设置反应温度为60 °C, 时间为30 min 进行甲酯化反应。

1.4.3 气相色谱条件: EPA 和DHA 甲酯通过气相色谱仪(火焰离子化检测器)进行分析; 色谱柱: DB-1701 (30 m×0.32 mm, 1.00 μm); 程序升温过程为: 以5 °C/min 的速度从140 °C 升至220 °C, 然后以10 °C/min 速度升至280 °C, 在280 °C保持10 min; FID 检测器温度: 300 °C; 样品汽化温度: 280 °C; 流速: 1.8 mL/min; 进样方式为分流模式: 分流比为42:1。

2 结果与讨论

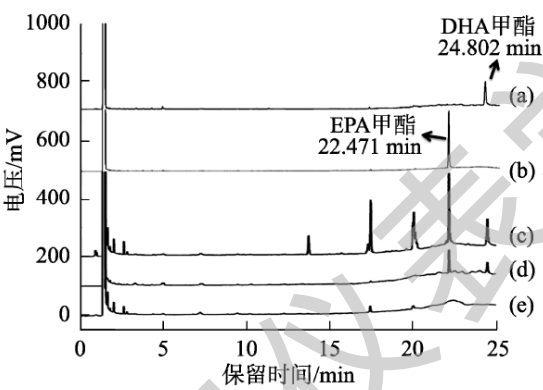
2.1 EPA 甲酯和 DHA 甲酯的色谱分离:

利用优化的色谱条件对质量浓度为1 mg/mL 的EPA甲酯和DHA 甲酯进行气相色谱检测, 色谱图如图2 所示, 二者的保留时间分别为22.471、24.802 min。分别使用5 mL甲醇、正己烷、超纯水柱层析依次洗脱磷虾甲酯产物, 对南极磷虾甲酯化产物进行气相分离, 3种洗脱液的色谱图如图2(c)、(d)、(e)所示。由谱图可知: EPA 和DHA甲酯2种组分分离良好且其余

组分不干扰测定, 使用5 mL甲醇、5 mL正己烷可将南极磷虾甲酯化产物完全洗脱下来。因此, 南极磷虾甲酯化产物均按照该溶剂体系进行洗脱, 洗脱液浓缩后进行气相色谱分析。

2.2 方法学验证

同等色谱条件下, 利用GC/FID 测定质量浓度为0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00 mg/mL 7 个浓度的EPA和DHA 甲酯混合标准溶液, 根据峰面积和浓度的线性关系得到标准曲线的方程式, 如表1 所示。使用二氯甲烷萃取过的南极磷虾作为样品空白, 加标50μg/g EPA 和DHA进行检出限(limits of detection, LODs)测定, 重复测试7次, 测试结果标准偏差的3.143 倍得到目标物检出限, 方法灵敏度较高。



注: (a): DHA 甲酯标准溶液; (b): EPA 甲酯标准溶液; (c): 甲醇洗脱液; (d): 正己烷洗脱液; (e): 超纯水洗脱液。

图 2 标准溶液和磷虾样品中 EPA、DHA 甲酯的气相色谱图
Fig.2 Gas chromatograms of EPA and DHA methyl esters in standard solutions and shrimps samples

2.3 甲酯转化条件优化

EPA 和DHA 甲酯化产物是对应的酯和水, 反应摩尔比均为1:1。反应时间、催化剂用量及反应温度是影响该系列羧酸酯化的主要因素, 因此本研究从这3 个因素入手进行优化, 以提高转化率。优化反应时, 反应过程中的EPA和DHA 甲酯含量由上述标准曲线方程确定。

2.3.1 反应时间

在60℃下, 将质量浓度为1.0 mg/mL EPA和DHA标准溶液与1.0% (V:V)硫酸甲醇溶液进行反应, 选取5、10、20、30、40、60 min 6 个时间点来监测反应转化率, 其中1.0%硫酸甲醇溶液与不饱和脂肪酸溶液体积比为1:1。

图3 为EPA和DHA的反应时间对酯化转化率的影响。反应开始至30 min, 酯化反应迅速进行, 转化率从15%增加到70%; 反应30 min后, EPA 和DHA 的酯化率趋于稳定直至停止, 可能是由酸性条件下部分羧酸酯水解引起。因此, 甲酯化最佳反应时间确定为30 min。

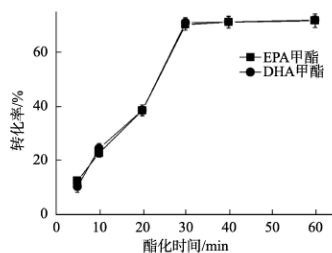
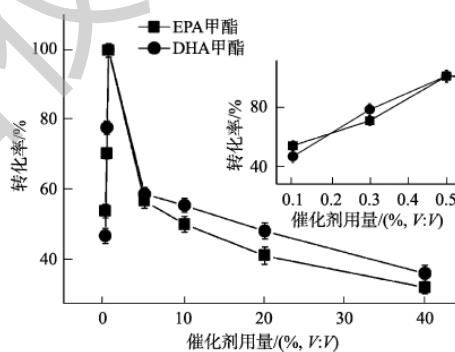


图3 不同酯化时间 EPA 和 DHA 的转化率(n=3)

Fig.3 Esterification rates of EPA and DHA at different times (n=3)

2.3.2 催化剂用量

脂肪酸的酯化反应为可逆反应，加入合适催化剂可以促进反应正向进行。而KOH 等强碱性催化剂会生成金属盐等皂化副产物，增加目标物的分离难度。因此，本研究采用硫酸-甲醇溶液作反应试剂，避免皂化，提高酯化率。在60 °C下，向1.0 mg/mL 的EPA 和DHA 标准溶液中加入不同浓度的硫酸-甲醇溶液，反应30 min 后监测反应转化率，选取0.1%、0.3%、0.5%、5.0%、10.0%、20.0%、40.0% 7 个催化剂浓度进行对比研究。如图4所示，催化剂浓度对EPA 和DHA 酯化速度影响明显。当硫酸浓度从0.1%增加到0.5%时，羧酸转化率急剧增加；0.5%的酸浓度条件下EPA 和DHA 酯化率达到最高；当酸浓度从5%增加至40%时，转化率则由100%降低至60%。由结果来看，0.1%的酸催化剂不足以完全催化EPA和DHA 的甲酯化，而当催化剂浓度大于0.5%时，产物会部分水解，进一步抑制酯化反应的发生。所以，本反应催化剂最佳用量为0.5%硫酸(V:V)。



注：插图表示催化剂浓度从0.1%增加到0.5%时的转化率变化。

图4 不同催化剂浓度下 EPA 和 DHA 的甲酯转化率(n=3)

Fig.4 Methyl ester conversion ratios of EPA and DHA at different catalyst concentrations (n=3)

综上所述，本研究依次从反应时间、催化剂用量和反应温度3 个角度对脂肪酸的酯化率进行讨论，每组反应均进行3 组平行实验。结果表明，在60 °C下，EPA 和DHA 混合溶液与0.5%硫酸-甲醇溶液反应30 min 酯化程度最高，为本研究验证的最佳酯化条件。将二氯甲烷

萃取过的南极磷虾进行基体加标, 分别加标0.2、0.5、1.0 mg EPA 和DHA制成不同浓度的空白加标样品, 按照1.4.3 和1.4.4 进行回收率实验, 重复测试3 次, 平均回收率分别为82.6%、91.1%、95.4%, 方法准确度较高。

2.4 实际样品检测

通过前述反应条件, 本研究利用优化后的酯化方法对磷虾萃取液中EPA 和DHA 含量进行检测, 平行检测3次, 试样的脂肪酸质量浓度以平均值 $\pm$ 标准偏差(mean $\pm$ SD)表示。表2列出了新鲜和干燥的南极磷虾样品中EPA 和DHA 的检测结果。其中新鲜样品为南极磷虾解冻后的样品,干燥样品为冷冻干燥条件下所得样品。每个样品平行测定3 次, 相对标准偏差在3.68~5.34%之间, 该方法重现性良好; 同时发现, 头部的EPA 和DHA 含量比腹部含量要高。结果表明, 本方法检测新鲜样品和冻干样品中EPA 和DHA 重现性好, 磷虾中多不饱和脂肪酸的含量与虾体部位有关。

3 结论

南极磷虾中的EPA 和DHA 在硫酸催化作用下可以转化为甲酯, 本研究探讨了反应时间、催化剂用量以及反应温度对EPA 和DHA 甲酯化反应的影响。结果显示, 在60 °C下, EPA 和DHA 混合溶液与0.5%硫酸-甲醇溶液反应30 min酯化程度最高。使用优化后的实验条件对新鲜和干燥南极磷虾样品不同部位的EPA 和DHA 进行气相色谱检测, 实验结果表明, 平行样品的相对标准偏差小于6% (n=3)。该方法在0.02~2.00 mg/mL 的线性范围内, 相关系数为0.9999, 检出限低、杂质干扰小、重现性好, 能够快速、便捷、准确检测南极磷虾中EPA 和DHA。

参考文献:

- [1] LUVONGA C, RIMMER CA, YU LL, et al. Organoarsenicals in seafood: Occurrence, dietary exposure, toxicity, and risk assessment considerations-A review [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(4): 943–960.
- [2] CONG XY, MIAO JK, ZHANG HZ, et al. Effects of drying methods on the content, structural isomers, and composition of astaxanthin in Antarctic krill [J]. ACS Omega, 2019, 4(19): 17972–17980.
- [3] ZHU GP, DENG B, ZHANG HT, et al. Ontogenetic and temporal diet variation in adult Antarctic krill *Euphausia superba* at South Georgia during austral winter revealed by stable

- isotope analysis [J]. *Fish Res*, 2019, 215: 1–8.
- [4] SECO J, FREITAS R, XAVIER JC, et al. Oxidative stress, metabolic activity and mercury concentrations in Antarctic krill *Euphausia superb* and myctophid fish of the Southern Ocean [J]. *Mar Pollut Bull*, 2021, 166: 112178.
- [5] 孙伟红, 邢丽红, 冷凯良, 等. 高效液相色谱法测定南极磷虾及其制品中虾青素的含量 [J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(4): 1248–1253.
- [6] ANGELOTTI A, SCHNELLI PM, RAATZ SK, et al. Evaluation of a rapid assessment questionnaire using a biomarker for dietary intake of n-3 fatty acids [J]. *Lipids*, 2019, 54(5): 321–328.
- [7] COLOMBO SM, SHUKLA K, CAMPBELL LG, et al. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid are linearly retained by common insect crop pests (Cabbage looper and bertha armyworm) and alter insect biomass [J]. *Physiol Entomol*, 2020, 45(1): 38–49.
- [8] 郑伟龙. 南极磷虾反式EPA 及DHA 抗肿瘤作用的研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2018.
- [9] BANNENBERG G, RICE HB, BERNASCONI A, et al. Ingredient label claim compliance and oxidative quality of EPA/DHA omega-3 retail products in the US [J]. *J Food Compos Anal*, 2020, 88: 103435.
- [10] 徐正, 赵宪勇, 尚德荣, 等. 不同加工方式对南极磷虾各组分的影响[J]. *食品安全质量检测学报*, 2014, 5(5): 1537–1541. XU Z, ZHAO XY, SHANG DR, et al. Effects of different processing methods on the Antarctic krill components [J]. *J Food Saf Qual*, 2014, 5(5): 1537–1541.
- [11] 郑景如, 孙馨娉, 蔡紫仪, 等. 优选南极磷虾蛋白肽抗氧化活性组分[J]. *食品安全质量检测学报*, 2020, 11(1): 189–195. ZHENG JR, SUN XP, CAI ZY, et al. Optimizing the antioxidant components of Antarctic krill protein peptides [J]. *J Food Saf Qual*, 2020, 11(1): 189–195.