

# 藻油中 DHA-EE 的 HPLC 快速定量方法的建立

谢枫才<sup>1,2</sup>, 张 宾<sup>1</sup>, 孙继鹏<sup>2</sup>

(1. 浙江海洋大学食品与医药学院, 浙江 舟山 316022; 2. 国家海洋局第三海洋研究所, 国家海洋局海洋生物资源综合利用工程技术研究中心, 福建 厦门 361005)

**[摘要]** 建立高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 快速测定藻油中二十二碳六烯酸乙酯 (docosahexaenoic acid ethyl ester, DHA-EE) 含量的方法。将藻油经乙酯化处理后, 采用优化后 DHA-EE 分析参数: 色谱柱 ZORBAX SB-C8 (4.6 mm × 250 mm), 流动相 V(甲醇): V(水) = 90: 10, 柱温为 30 ℃, 流速为 1.0 mL/min, 紫外检测波长为 204 nm, 进样量为 10 μL。测定结果显示, DHA-EE 在 0.008 1 ~ 1.92 μg 范围内呈良好线性关系, 线性回归方程为:  $y = 39.91x + 765.11$  ( $R^2 = 0.9992$ ), 平均回收率为 102.42% ( $n = 5$ , RSD = 2.25%), 精密度 ( $n = 10$ , RSD = 0.32%) 较好, DHA-EE 最低定量限达 8.05 ng。表明, 该方法可用于藻油及其制品中 DHA-EE 的检测分析。

**[关键词]** 藻油; 二十二碳六烯酸乙酯; 高效液相色谱; 定量分析

**[中图分类号]** TS 227

## HPLC Method for Rapid Determination of DHA-EE in Algae Oil

XIE Fengcai<sup>1,2</sup>, ZHANG Bin<sup>1</sup>, SUN Jipeng<sup>2</sup>

(1. College of Food Science and Pharmacy, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Engineering Research Center of Marine Biological Resource Comprehensive Utilization, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** High performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to quantify DHA-EE in marine microalgae oil quickly. The optimized quality parameters for DHA-EE analysis were as follows: chromatographic column, ZORBAX SB-C8 (4.6 mm × 250 mm); mobile phase, methanol versus water (90: 10); the column temperature 30 ℃; the flow velocity 1.0 mL/min; UV wavelength 204 nm; the injection volume 10 μL. It presented a good linear relationship within range of 0.008 1-1.92 μg for DHA-EE, and the linear regression equation was  $y = 39.91x + 765.11$  ( $R^2 = 0.9992$ ). The average recovery rate was 102.42% ( $n = 5$ , RSD = 2.25%) with good precision ( $n = 10$ , RSD = 0.32%), and the minimum quantify limit reached 8.05 ng. This optimized HPLC method could be used in the determination and analysis of algal oil and DHA-EE.

**Keywords:** algae oil; DHA-EE; HPLC; quantitative analysis

## 0 引言

二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic acid, DHA) 属  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸, 是人类大脑及视网膜的重要成分。DHA 具有调节人体内脂蛋白、血脂正常代谢和降血压作用, 并能降低血液黏稠度和胆

[收稿日期] 2017-11-30

[修回日期] 2018-02-28

[基金项目] 国家重点研发计划项目 (2017YFD0400105-05); 厦门市海洋经济创新发展区域示范项目 (16CZP012SF04)

[作者简介] 谢枫才 (1993—), 男, 硕士生, 从事天然产物的提取与应用研究。通信作者: 张宾 (1981—), 男, 副教授, 博士, 从事水产品加工及贮藏方向研究, E-mail: zhangbin@zjou.edu.cn。

固醇水平,预防动脉硬化<sup>[1-4]</sup>。大量研究表明,DHA 缺乏会引起婴幼儿或儿童脑部发育受阻,致使视力障碍及记忆力下降<sup>[5-6]</sup>。鱼油中富含丰富的 DHA,市场上的 DHA 产品主要是从深海鱼油中提取,但是鱼油易受到环境、气候等因素影响而发生劣变,目前其产量仅能满足世界需求量的 60% 左右<sup>[7]</sup>。

微藻在海洋中的角色为初级生产力,许多微藻能自身合成 DHA,其 DHA 相对含量远远高于鱼油中 DHA 含量<sup>[8]</sup>。此外,藻油属于食物链最低端,其不含海洋污染物和胆固醇,且较为纯净、腥味小及稳定性好,产品回收率高于鱼油<sup>[9-10]</sup>。研究表明,同等剂量不同来源的 DHA 对儿童记忆力的影响具有相同作用<sup>[11]</sup>,因此,藻油作为 DHA 的重要来源一直备受关注。DHA 可分为甲酯型、乙酯型、甘油酯型和游离型 4 类。目前市场上 DHA 产品多为乙酯型,如美国 FDA 药品数据库收录的 6 个  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸<sup>[12]</sup>、美国药典 (USP35) 和欧盟药典 (07/2012: 1250) 收录的  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸均为乙酯型。

对于鱼油及藻油产品中 DHA 的检测方法,目前主要采用气相色谱法<sup>[13-14]</sup>,但由于 DHA 属于长链脂肪酸,不易气化,所以检测时需在较高温度下进行且分析时间较长<sup>[15]</sup>。因此,为避免高温对 DHA 稳定性的影响,人们逐渐尝试采用高效液相色谱法 (high performance liquid chromatography, HPLC) 作为 DHA 含量的检测分析方法<sup>[16]</sup>。藻油中不饱和脂肪酸包含 DHA 和二十二碳五烯酸 (docosahexaenoic acid, DPA) 2 类, HPLC 法较难将两者进行分离,会造成 DHA 测定结果偏高。因此,本文针对以上问题,建立基于 HPLC 的藻油中 DHA 乙酯 (docosahexaenoic acid ethyl ester, DHA-EE) 的分析方法,在优化检测参数基础上,评价建立方法的精密度和准确度,旨在实现藻油样品中乙酯型 DHA 含量的高效快速定量分析。

## 1 实验方法

### 1.1 仪器和试剂

LC-1260 型高效液相色谱仪、GC7890B 气相色谱仪器、紫外检测器,美国安捷伦科技有限公司; Milli-Q 型超纯水仪,密理博中国有限公司; ME104E 型分析天平,德国梅特勒公司; DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器,上海予华仪器设备公司。

乙酯型 DHA 标准品 (DHA-EE, 纯度 >99.6%), 美国 Sigma-Aldrich 公司; 乙酯型 DPA 标准品 (DPA-EE, 纯度 >99.6%), 美国 Nu-Chek 公司; 甲醇、正己烷 (色谱纯), 德国 Merck 公司; 无水乙醇、氢氧化钠 (分析纯), 西陇科学股份有限公司; 国内某品牌藻油待测样品。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: ZORBAX SB-C8 (4.6 mm × 250 mm)、SHIMADZU C18 (4.6 mm × 250 mm)、InertSustainSwift C18 (4.6 mm × 250 mm); 柱温为 30 °C; 流动相  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 80:20, 85:15, 90:10$ ; 流速分别为 0.5, 0.8, 1.0 mL/min; 进样量为 10  $\mu\text{L}$ ; 检测波长为 204 nm。

### 1.3 标准样品制备

准确称取 38.4 mg DHA-EE 标准品置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容摇匀后, 采用 HPLC 法进行分析检测。准确称取 37.3 mg DHA-EE 标准品置于 10 mL 容量瓶中, 正己烷定容摇匀后, 采用 HPLC 法检测。将 DPA-EE 标准品置于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容摇匀, 采用 HPLC 法进行分析检测。

### 1.4 藻油样品制备

在 250 mL 三颈烧瓶中放入藻油样品 10 g, 恒温水浴升温至 55 °C 后, 将含有 0.016 g NaOH 的无水乙醇 (30 mL) 加入三颈烧瓶中, 密闭容器在恒温水浴磁力搅拌反应 16 h。反应结束后, 减压蒸发将乙醇去除。准确称取待测乙酯化藻油样品 1.0 g 于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀后用于 HPLC 分析。

## 2 结果

### 2.1 色谱柱的选择

在相同色谱条件下, DHA-EE 与 DPA-EE 在 ZORBAX SB-C8、Inert Sustain Swift C18、SHIMADZU

C18 色谱柱上分离及出峰情况, 如图 1 所示。综合考虑 DHA-EE 与 DPA-EE 的分离度、保留时间和峰形等色谱因素, 发现二者在 ZORBAX SB-C8 色谱柱上的保留时间相对较短, 色谱峰形较为对称, 且 DPA-EE 与 DHA-EE 分离度为 11.44, 分离效果良好。因此, 选用 ZORBAX SB-C8 色谱柱进行后续的 DHA-EE 与 DPA-EE 定量检测分析。

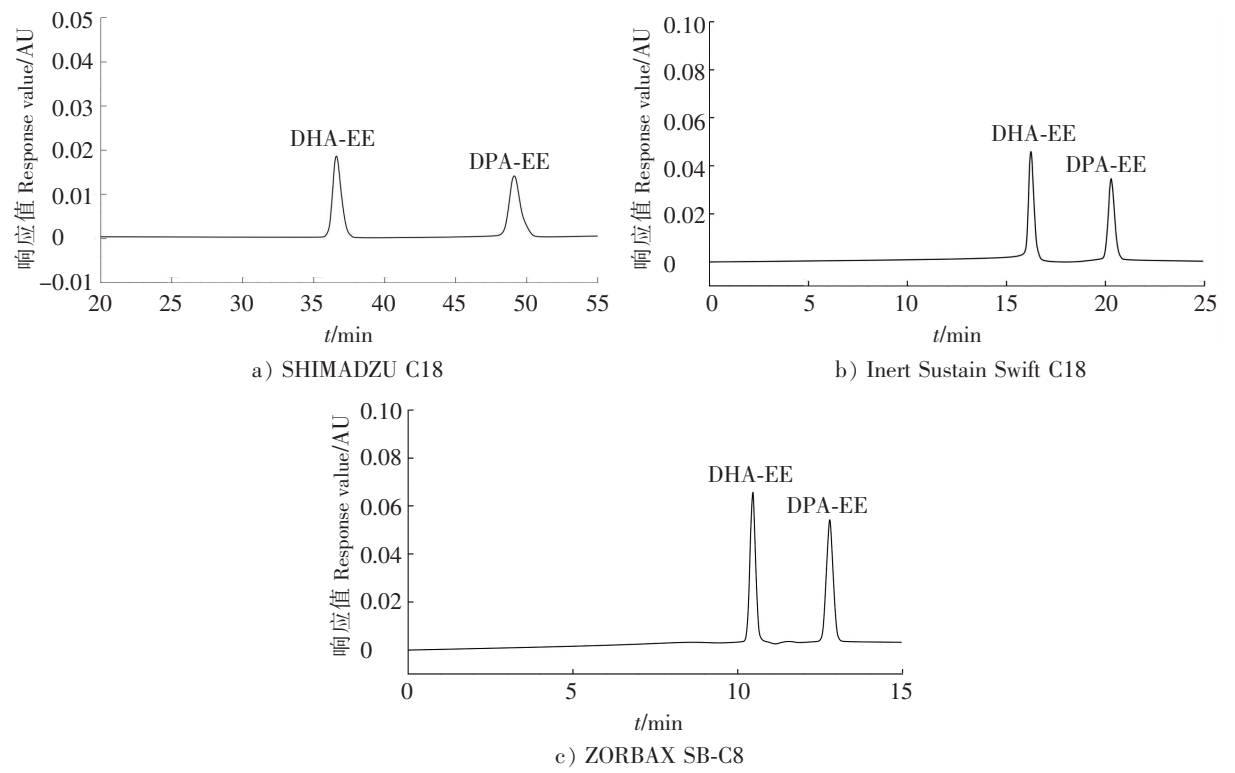


图 1 DHA-EE 与 DPA-EE 在不同色谱柱上的分离色谱图

Fig.1 Separation chromatograms of DHA-EE and DPA-EE on different columns

2.2 分离条件的选择

2.2.1 检测波长的选择

考察不同波长对 DHA-EE 和 DPA-EE 分离效果、DHA-EE 含量的影响, 对藻油进行 100 ~ 800 nm 全波长扫描, 结果如图 2 所示。当波长为 204 nm 时, DHA-EE 分离峰可与 DPA-EE 及其他杂峰达到基线分离, 可满足分析检测要求。DHA-EE 最大吸收峰出现在波长 204 nm 处。综合考虑色谱分离效果及 DHA-EE 吸收值, 选择波长 204 nm 进行后面的分析。

2.2.2 流动相的选择

考察甲醇与水的不同配比 ( $V:V$ ) 对 DHA-EE 和 DPA-EE 分离效果影响, 结果如图 3 所示。当  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$  时, DHA-EE 分离峰可与 DPA-EE 及其他杂峰达到基线分离, 可满足分析检测要求。该流动相条件下, 其分离运行时间显著优于  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 80:20$  和  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 85:15$  这两个比例的, 从而可提高实验的分析效率。综合考虑色谱分离时间及效果, 选择  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$  作为流动相进行后面的分析。

2.2.3 流速的选择

在确定流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$  条件下, 考察不同流速 (0.5, 0.8, 1.0 mL/min) 对 DHA-EE 和 DPA-EE 分离效果影响, 结果如图 4 所示。综合考虑 DHA-EE 和 DPA-EE 分离度、保留时间、色谱峰峰形及其他杂质峰等因素, 选择流动相流速为 1.0 mL/min, 获得的 DHA-EE 和 DPA-EE 保留时间较为合理, 且色谱峰峰形对称。

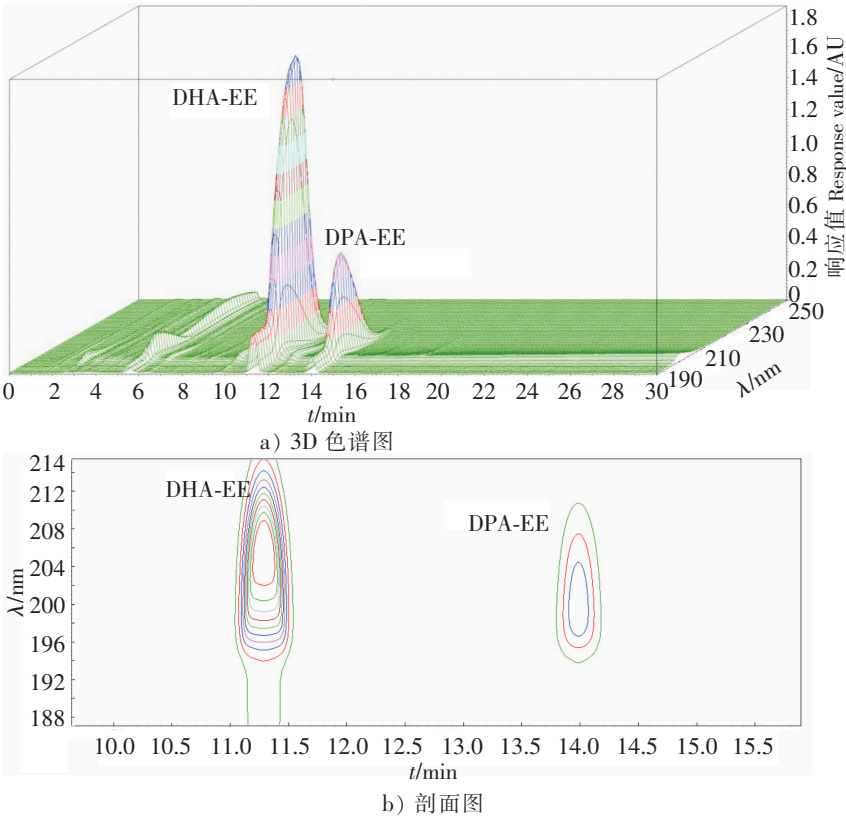


图 2 藻油全波长扫描 3D 色谱图与剖面图

Fig.2 Algae oil full-wavelength scanning 3D chromatogram and cross-sectional view

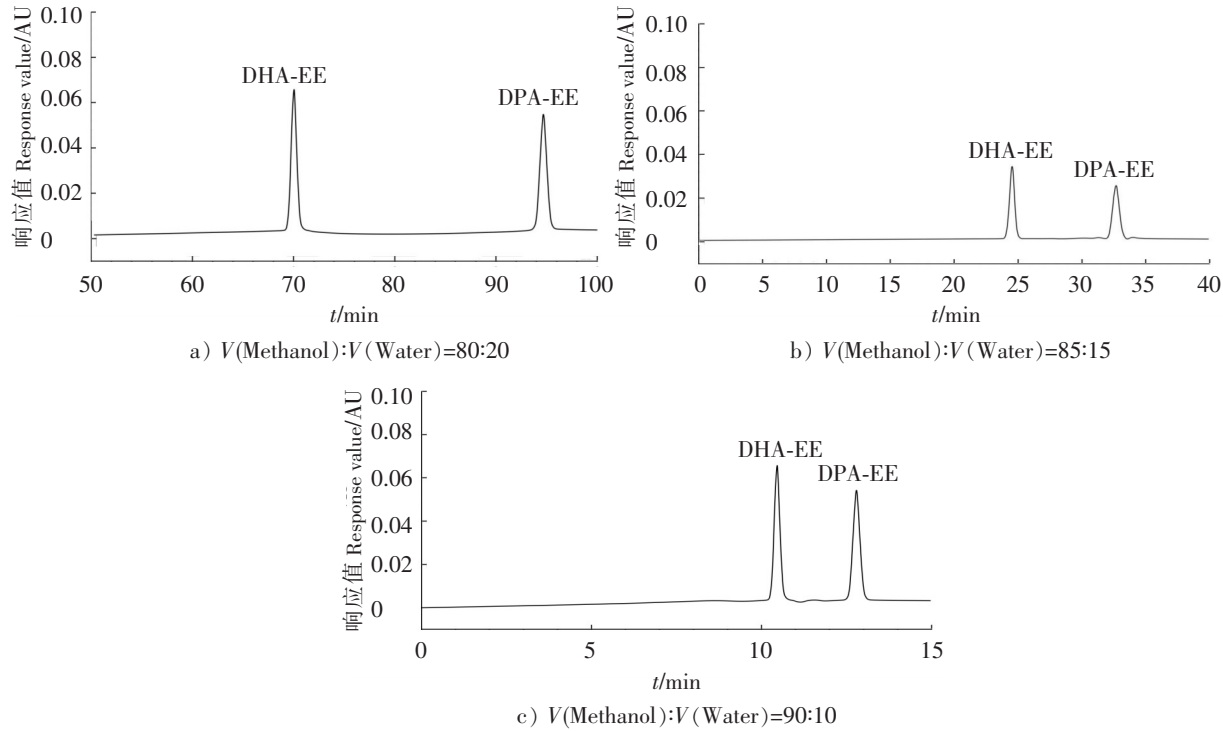


图 3 不同流动相下 DHA-EE 与 DPA-EE 分离色谱图

Fig.3 Separation chromatograms of DHA-EE and DPA-EE under the different mobile phase

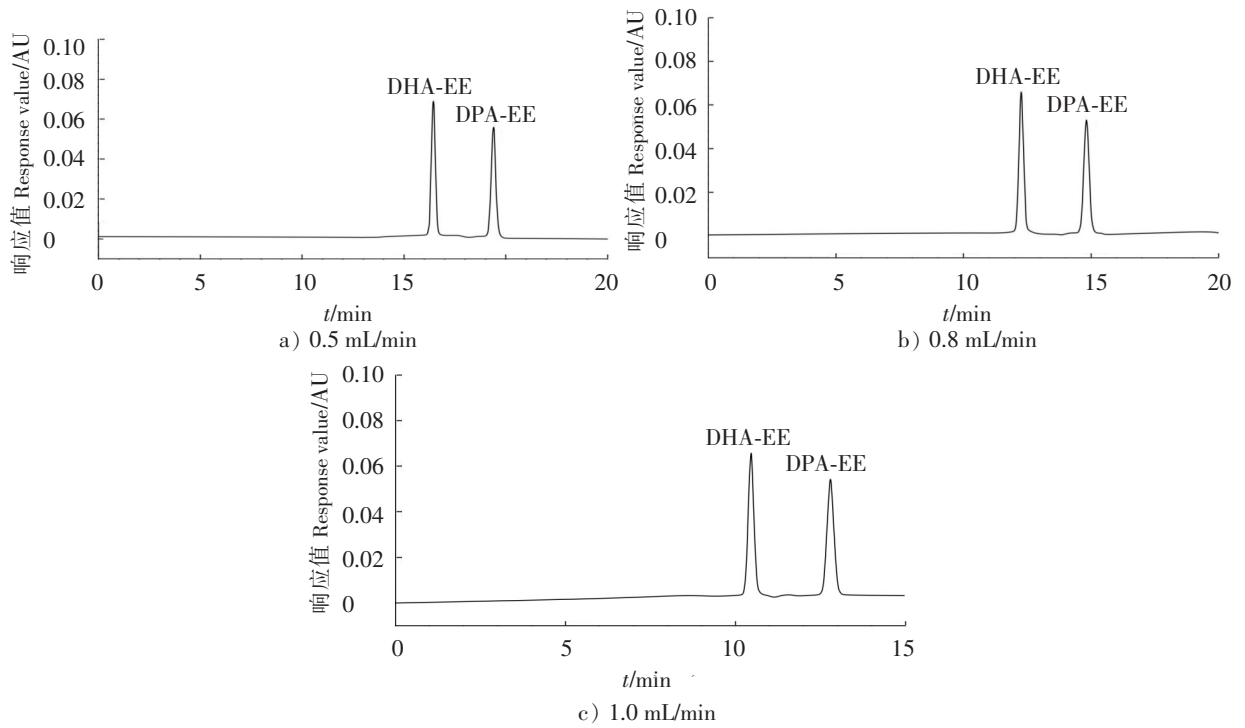


图 4 不同流速下 DHA-EE 与 DPA-EE 分离色谱图

Fig.4 Separation chromatograms of DHA-EE and DPA-EE under the different flow rate of mobile phases

综上, DHA-EE 与 DPA-EE 的 HPLC 分析采用 ZORBAX SB-C8 (4.6 mm × 250 mm) 色谱柱, 流动相为  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$ , 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 204 nm, 柱温为 30 ℃。

2.3 标准曲线的绘制

取不同浓度的 DHA-EE 标准品溶液进样 HPLC 检测, 测定分离峰的面积响应值, 建立 DHA-EE 回归方程为:  $y = 39.91x + 765.11$  ( $R^2 = 0.9992$ ), 在 0.008 1 ~ 1.92 μg 范围内呈良好线性关系, 进而绘制峰面积 - 浓度之间的相关关系, 如图 5 所示。

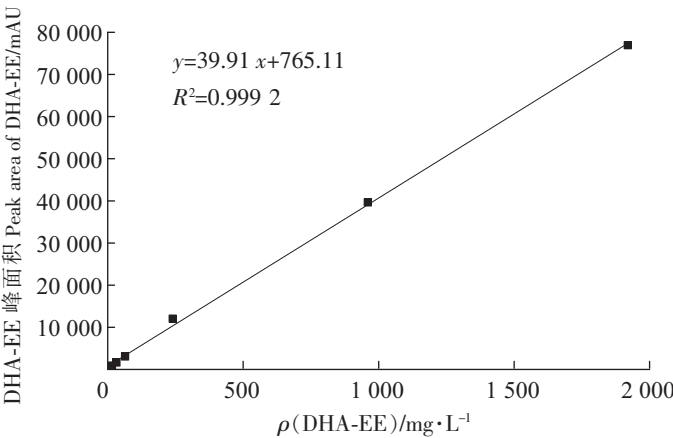


图 5 DHA-EE 标准曲线图

Fig.5 The standard curve of DHA-EE

2.4 精密度分析

取一定浓度的 DHA-EE 标准品溶液连续进样 10 次进行 HPLC 分析, 通过分离峰面积响应值计算相对标准偏差为  $\text{RSD} = 0.1\%$ , 表明仪器精密度良好 (见表 1)。

表 1 仪器精密度试验  
Tab.1 The precision experiment of the equipment

分析次数 Numbers of analysis	DHA-EE 峰面积 Peak area of DHA-EE /mAU	峰面积平均值 Average value of peak area /mAU	SD	RSD/%
1	51 047.8	50 857.55	161.098	0.32
2	50 585.2			
3	50 846.3			
4	51 162.4			
5	50 830.3			
6	50 847.6			
7	50 750.9			
8	50 754.6			
9	50 817.3			
10	50 933.1			

2.5 稳定性分析

取 DHA-EE 标准品溶液分别放置 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 h 后进行测定, 通过峰面积响应值来计算相对标准偏差, 获得 DHA-EE 的 RSD 为 0.25%, 表明样品在 24 h 内 DHA-EE 稳定性良好 (见表 2)。

表 2 DHA-EE 稳定性试验  
Tab.2 The stability experiment of DHA-EE

时间 Time /h	DHA-EE 峰面积 Peak area of DHA-EE /mAU	峰面积平均值 Average value of peak area /mAU	SD	RSD/%
0	35 209.5	35 318.88	88.523	0.25
2	35 275.5			
4	35 265.4			
6	35 359.1			
8	35 371.2			
10	35 214.1			
12	35 450.3			
16	35 269.2			
20	35 318.7			
24	35 455.8			

2.6 定量限分析

根据仪器信噪比 (S/N) 小于 3 为标准, DHA-EE 最低定量限为 7.10 ng, 仪器信噪比 (S/N) 大于 10 为标准, DHA-EE 最低定量限为 8.05 ng。

2.7 加标回收率测定

取不同含量的藻油样品 5 份, 加入一定量的 DHA-EE, 做加标回收, 结果表明, DHA-EE 加标回收率平均值为 102.42%, RSD 为 2.25%, 表明加样回收率良好, 结果见表 3。

2.8 待测样品分析

取 3 份乙酯化后藻油样品, 按照上述优化后方法进行 HPLC 检测; 另外取 3 份相同样品, 进行气相色谱 (gas chromatography, GC) 检测, 进行对比分析。GC 检测条件: 进样口温度为 270 ℃, 总流量为 30 mL/min, 柱流量为 1 mL/min、分流比为 10:1, 色谱柱为 SP-2560, 检测器温度 280 ℃。HPLC 法对藻油中 DPA-EE 与 DHA-EE 分离效果如图 6 所示, 测得结果见表 4。可见, 2 种方法测得 DHA-EE 含量相差不大, 且都能保持稳定, 均可作为藻油中 DHA-EE 含量测定方法。但从分析效率来



看, HPLC 法保留时间与 GC 法对比, 显著缩短了检测时间, 提高了检测效率。因此, 高效液相色谱法更优于气相色谱法。

表 3 DHA-EE 回收率测定  
Tab. 3 The recovery rate of DHA-EE

样品中 DHA-EE 含量 Content of DHA-EE /mg	DHA-EE 加入量 Addition amount of DHA-EE/mg	DHA-EE 测得量 Measurement of DHA-EE/mg	DHA-EE 回收率 Recovery rate of DHA-EE/ %	DHA-EE 回收率平均值 Average value of DHA-EE recovery rate/%	SD	RSD/%
11.697	10.000	22.127	104.30	102.42	2.30	2.25
12.671		22.915	102.44			
12.910		23.168	102.58			
13.489		24.040	105.51			
13.826		23.840	100.14			
15.894		25.851	99.56			

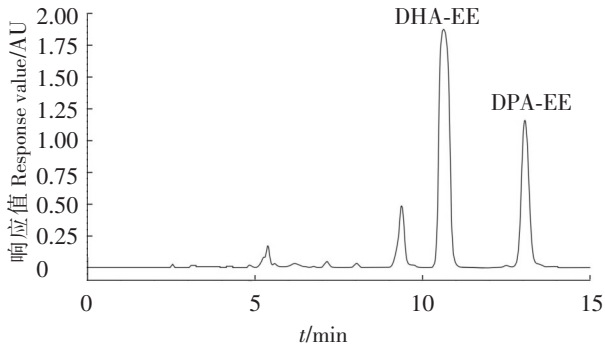


图 6 藻油色谱图

Fig.6 Separation chromatogram of algae oil

表 4 藻油样品中 DHA-EE 含量  
Tab. 4 The content of DHA-EE in algal oil

编号 Number	GC		HPLC	
	质量分数 Content /%	保留时间 Retention time/min	质量分数 Content /%	保留时间 Retention time/min
1	55.85	60.07	54.45	10.55
2	55.85	60.06	54.58	10.52
3	55.55	60.11	54.52	10.61
平均 Average	55.60	60.08	54.52	10.54

3 讨论

目前, 对 DHA-EE 含量的分析主要采用气相色谱法进行测定。根据相关文献报道, 气相色谱法存在一定的技术问题, 如长链碳的脂肪不易气化、保留时间长<sup>[9]</sup>。此外, 采用气相色谱法对 DHA-EE 含量进行测定, 测定结果显示, DHA-EE 线性回归方程  $y = 1\,503\,x - 26.275$ , 相关系数  $R^2 = 0.999\,1$ , 在  $14.52 \sim 746.00\,\text{ng}$  范围内呈现良好线性关系。但气相色谱法一般采用分流进样, 要获得较好的峰形, 需设置较大的分流比, 同时还要相应增加样品溶液的浓度。本文中, 采用高效液相色谱法对海洋微藻油中 DHA-EE 含量测定, 建立 DHA-EE 回归方程为  $y = 39.91\,x + 765.11$  ( $R^2 = 0.008\,1$ ), 其在  $0.008\,1 \sim 1.92\,\mu\text{g}$  范围内呈良好线性关系, 且对藻油中 DHA-EE 与 DPA-EE 分离效果良好, 相比气相色谱法更为快速、简便可行。

4 结论

本文以藻油中乙酯型 DHA 为分析对象, 建立了基于 HPLC 的藻油中 DHA-EE 分离检测方法。结果显示, 当采用 ZORBAX SB - C8 色谱柱, 流动相以  $V(\text{甲醇}):V(\text{水}) = 90:10$ , 流速为  $1.0\,\text{mL}/\text{min}$ , 检测波长为  $204\,\text{nm}$ , 柱温为  $30\,^{\circ}\text{C}$  和进样量为  $10\,\mu\text{L}$  时, DHA-EE 在  $0.008\,1 \sim 1.92\,\mu\text{g}$  范围内呈现良好线性关系, 测定平均回收率为  $102.42\%$  ( $n = 5, \text{RSD} = 2.25\%$ ), 精密度良好 ( $n = 10, \text{RSD} =$

0.32%), DHA-EE 最低定量限可达 8.05 ng。建立的 DHA-EE 分析方法,表现出较好的精密度及稳定性,其待测样品耗量少且成本较低,可用于藻油及其制品中 DHA-EE 含量的测定,该方法也可以应用于目前乙酯型 DHA 产品的定量检测。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] YURKO MAURO K, MCCARTHY D, ROM D, et al. Beneficial effects of docosahexaenoic acid on cognition in age-related cognitive decline [J]. *Alzheimers & Dementia the Journal of the Alzheimers Association*, 2010, 6(6): 456-464. DOI:10.1016/j.jalz.2010.01.013.
- [2] HOLUB B J. Docosahexaenoic acid (DHA) and cardiovascular disease risk factors [J]. *Prostaglandins Leukotrienes & Essential Fatty Acids*, 2009, 81(2/3): 199-204. DOI:10.1016/j.plefa.2009.05.016.
- [3] KANDASAMY N, JOSEPH F, GOENKA N. Review: the role of omega-3 fatty acids in cardiovascular disease, hypertriglyceridaemia and diabetes mellitus [J]. *British Journal of Diabetes & Vascular Disease*, 2008, 8(3): 121-126. DOI: 10.1177/14746514080080030301.
- [4] DEWAILLY E, BLANCHET C, GINGRAS S, et al. Cardiovascular disease risk factors and *n*-3 fatty acid status in the adult population of James Bay Cree [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2002, 76(1): 85-92.
- [5] 陶宁萍, 鲍丹. 鱼油的营养和药用价值及其提取工艺的研究进展 [J]. *上海水产大学学报*, 2005, 14(2): 197-200. DOI:10.3969/j.issn.1004-7271.2005.02.018.
- [6] 王靖, 胡志雄, 许春芳, 等. 冷冻结晶法富集藻油中 DPA 和 DHA 甘油酯的研究 [J]. *中国油脂*, 2015, 40(7): 69-72. DOI:10.3969/j.issn.1003-7969.2015.07.015.
- [7] 梁英, 麦康森. 微藻 EPA 和 DHA 的研究现状及前景 [J]. *水产学报*, 2000, 24(3): 289-296. DOI:10.3321/j.issn:1000-0615.2000.03.018.
- [8] REITAN K I, RAINUZZO J R, OLSEN Y. Effect of nutrient limitation on fatty acid and lipid content of marine microalgae [J]. *Journal of Phycology*, 2010, 30(6): 972-979. DOI:10.1111/j.0022-3646.1994.00972.x.
- [9] 彭云, 李汴生, 林应胜, 等. 微藻 DHA 在蛋糕中的应用 [J]. *现代食品科技*, 2012, 28(2): 200-203. DOI:10.3969/j.issn.1673-9078.2012.02.017.
- [10] 曹万新, 孟橘, 田玉霞. DHA 的生理功能及应用研究进展 [J]. *中国油脂*, 2011, 36(3): 1-4.
- [11] 丁慧萍, 李艳红, 丁倩, 等. 藻油及鱼油二十二碳六烯酸复方制剂对儿童记忆功能的影响 [J]. *中华临床营养杂志*, 2011, 19(2): 129-132. DOI:10.3760/cma.j.issn.1674-635X.2011.02.015.
- [12] 陈殊贤, 郑晓辉. 微藻油和鱼油中 DHA 的特性及应用研究进展 [J]. *食品科学*, 2013, 34(21): 439-444. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201321085.
- [13] 全文琴, 陈小娥, 陈洁, 等. 高效液相色谱/质谱联用直接测定鱼油中 EPA/DHA 含量 [J]. *食品与机械*, 2008, 24(2): 114-117.
- [14] 刘爱琴, 罗超杰, 孙晓霞, 等. 气相色谱法测定鱼油微胶囊中 EPA 和 DHA 的含量 [J]. *中国食品添加剂*, 2010(4): 273-276.
- [15] 彭宏伟, 张博, 杨小川, 等. HPLC 法测定鱼油中二十碳五烯酸、二十二碳六烯酸的含量 [J]. *中国药房*, 2010, 21(13): 1228-1230.
- [16] 张怡评, 晋文慧, 陈伟珠, 等. 高效液相色谱法测定鱼油中的 EPA 乙酯和 DHA 乙酯 [J]. *中国食品添加剂*, 2012(1): 233-237.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)