

HPLC 示差折光法测定藻油中 DHA 的含量

肖小年¹, 侯小晶¹, 易 醒^{2*}¹南昌大学食品科学与技术国家重点实验室, 中德联合研究院, 南昌 330047; ²江西中德食品工程中心, 南昌 330047

摘要:首次采用 HPLC 示差折光法测定藻油中 DHA 的含量。色谱柱为 Eclipse XDB-C₁₈ (Analytical 4.6 × 250 mm 5 μm), 流动相为乙腈: 四氢呋喃: 水 (含 0.4% HAC) = 77: 3: 20, 柱温为 30 °C, 流速为 1.0 mL/min。该条件下 DHA 在 0.259 ~ 6.225 mg/mL 内呈良好的线性关系, 相关系数 $R^2 = 0.9995$, 平均回收率为 101.15%, RSD 为 1.98% ($n = 6$)。该方法可靠、简便、重现性好, 可作为藻油中 DHA 的定量方法。

关键词:高效液相色谱法 (HPLC); 示差折光检测器; 藻油; 二十二碳六烯酸 (DHA); 测定

中图分类号: R917

文献标识码: A

Determination of DHA in Algae Oil by HPLC with Differential Refractive Index Detector

XIAO Xiao-nian¹, HOU Xiao-jing¹, YI Xing^{2*}

¹State Key Laboratory of Food Science and Technology, Sino-German Joint Research Institute, Nanchang University, Nanchang 330047, China; ²Jiangxi Sino-German Food Engineering Center, Nanchang University, Nanchang 330047, China

Abstract: The content of DHA in algae oil was firstly determined by HPLC with differential refractive index detector. The sample was analyzed in a Eclipse XDB-C₁₈ (Analytical 4.6 × 250 mm 5 μm) with acetonitrile : tetrahydrofuran : water (containing 0.4% HAC) = 77: 3: 20 as the mobile phase, the column temperature was fixed at 30 °C and the flow rate was 1.0 mL/min. The standard curves of DHA presented the good linear correlation in the range of 0.259 ~ 6.225 mg/mL ($R^2 = 0.9995$). The average recovery rate of DHA was 101.15% and the RSD ($n = 6$) was 1.98% under this condition. The results showed that HPLC method was reliable and simple with good reproducibility for determining DHA in algae oil.

Key words: HPLC; differential refractive index detector; algae oil; docosahexaenoic acid (DHA); determination

二十二碳六烯酸 (DHA) 是 $\omega-3$ 系多不饱和脂肪酸 ($\omega-3$ PUFA)。由于含有六个双键的特有结构, 使其对人类健康有特殊的作用和影响。其主要生理作用有促进脑、视网膜形成和延缓脑的衰老, 抑制血小板凝集, 减少血栓的形成, 可以降低血脂, 预防和治理动脉粥样硬化, 可以抑制肿瘤生长, 抗炎, 抑制过敏反应等^[1, 2]。由于 DHA 对维持健康的重要性, 以及良好的疗效和很小的副作用等优点, 使其一跃而成为一种新型的营养品、保健品和疗效食品的主要功能成分。由于藻油中富含 DHA, 可作为 DHA 的良好来源, 基于此, 我们对藻油中的 DHA 含量建立定量方法。

脂肪酸的含量测定一般采用气相色谱法^[3, 4],

但其缺点是在分析过程中柱温很高, 易使不饱和脂肪酸的双键断裂或产生双键的异构化现象, 致使分析结果不准确, 使气相色谱法的应用受到限制。高效液相色谱法具有高效、快速、条件温和等优点, 用于不饱和脂肪酸的分析测定也已有不少报道, 多采用柱前衍生高效液相色谱法^[5, 6], 但前处理过程复杂, 且需加入内标物。本实验采用不经衍生化的高效液相色谱法 (HPLC), 用示差折光检测器直接测定藻油中 DHA 的含量。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

DHA 对照品 (上海众意泰国际贸易有限公司, 纯度 $\geq 99\%$); 藻油 (江西泰成生物科技有限公司); 乙腈、四氢呋喃为色谱纯; 氢氧化钾、无水乙醇、石油醚等为分析纯。

收稿日期: 2010-06-12 接受日期: 2010-11-02

基金项目: 江西省教育厅课题 (GJJ09083)

* 通讯作者 Tel: 86-013970854483; E-mail: yixingt@ hotmail.com

1.2 主要仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有 G1362 示差折光检测器及 G2170BA 化学工作软件(美国 Agilent 科技有限公司); KQ5200 超声波清洗器 昆山市超声波仪器有限公司; ER-480A 分析天平(A&D Company Limited); RE52CS-4 旋转蒸发仪(上海亚荣生化仪器厂); DK-S 24 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ (Analytical 4.6 × 250 mm 5 μm); 流动相为乙腈: 四氢呋喃(THF): 水(含 0.4% HAC) = 77: 3: 20, 等度洗脱; 柱温为 30 °C; 流速为 1.0 mL/min; 示差折光检测器; 进样量 20 μL。

1.3.2 对照品溶液的制备

精密称取 DHA 对照品 62.25 mg, 置于 10 mL 的容量瓶中, 用乙腈: 四氢呋喃 = 4: 1 混合液定容至刻度, 摇匀, 制成对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液的制备

精密称取藻油 0.1 g, 加入 40 mL 无水乙醇、10 mL 30% KOH 溶液、10 mL 10% 抗坏血酸溶液, 超声混匀后, 搅拌皂化 50 min, 再用石油醚萃取三次, 弃去石油醚层, 调节水层 pH 为 3.5, 使脂肪酸盐转变为脂肪酸。用石油醚再次萃取三次, 得到的石油醚层经旋转蒸发仪蒸干得到的脂肪酸, 用乙腈: 四氢呋喃 = 4: 1 稀释并定容至 10 mL, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过后供上机测定。

1.3.4 标准曲线的建立方法

逐次吸取一定体积 1.3.2 项下的对照品溶液, 逐级稀释, 使得其中 DHA 系列浓度为 0.259, 0.519, 1.038, 2.075, 4.150, 6.225 mg/mL; 分别取上述溶液各 20 μL 进样, 同一浓度的溶液连续进样三次, 记录峰面积, 取三次的平均值。以对照品溶液浓度(mg/mL)为横坐标, 峰面积(mAU)为纵坐标进行线性回归。

1.3.5 精密度实验

精密吸取上述 0.519 mg/mL 对照品溶液 20 μL, 连续进样 7 次, 记录峰面积, 计算相对标准偏差 RSD。

1.3.6 稳定性实验

取一份藻油样品 0.1 g, 按 1.3.3 项制备供试品溶液, 室温避光下放置, 每隔 2 h 测定 1 次, 共 5 次, 记录峰面积, 计算相对标准偏差 RSD。

1.3.7 重复性实验

精密称取同一批藻油样品 5 份, 每份 0.1 g, 按 1.3.3 项制备供试品溶液, 在上述色谱条件下测定, 计算 DHA 的含量。

1.3.8 加样回收率实验

精密吸取一定量的对照品溶液, 分别加入到已知含量的 6 份供试品溶液中, 在上述色谱条件下分析, 计算方法加样回收率。

2 结果与讨论

2.1 色谱条件的选择

用 C-18 反相色谱柱, 乙腈: THF: 水(含 0.4% HAC) = 77: 3: 20 作为流动相, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30 °C, 示差折光检测器检测, DHA 的保留时间为 8.149 min。

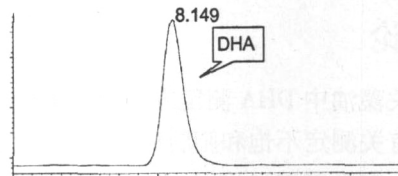


图1 对照品溶液 HPLC 图

Fig. 1 The HPLC chromatogram of the reference substance solution

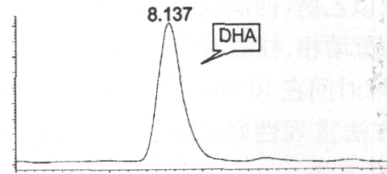


图2 供试品溶液 HPLC 图

Fig. 2 The HPLC chromatogram of the sample solution

2.2 按 1.3.2 中方法配制对照品溶液并按色谱条件进行 HPLC 分析测定, 结果表明: DHA 在 0.259 ~ 6.225 mg/mL 浓度范围内线性关系良好, 回归方程为 $Y = 172060X + 7956.2$, $R^2 = 0.9995$ 。

2.3 精密度实验

DHA 对照品的 RSD 为 1.095% ($n = 7$) 表明方法精密度良好。

2.4 稳定性实验

结果表明: 供试品溶液在 8 h 内性质稳定, RSD 为 2.04%。

2.5 重复性实验

结果表明: 藻油中 DHA 的平均含量为 21.97

% RSD 为 1.09% 此法重现性良好。

2.6 加样回收率实验

表 1 加样回收率

Table 1 Recovery ratio of the method

样品量 (mg) Content	加入量 (mg) Added	测得总量 (mg) Totals	回收率 (%) Recovery rate	平均回收率 (%) Average recovery rate	RSD (%)
0.445	0.830	1.290	101.18		
0.668	0.830	1.480	98.80		
0.891	0.830	1.748	101.57		
1.113	0.415	1.589	103.99	101.15	1.98
1.336	0.415	1.733	98.97		
1.559	0.208	1.809	102.38		

结果见表 1。从表 1 可知, DHA 的平均回收率为 101.15% ,RSD 为 1.98% ,可见该方法的回收率高。

3 结论

有关藻油中 DHA 测定方法国内未见报道, 本实验是在有关测定不饱和脂肪酸的文献基础上加以改进而来。有学者曾采用 C₈ 反相柱, 以乙腈: 四氢呋喃: 水(含 0.4% HAC) = 62: 3: 35 为流动相, 示差折光检测器检测谷物中不饱和脂肪酸-亚油酸的含量^[7]。我们在此基础上反复试验, 最终发现采用 C₁₈ 反相柱, 以乙腈: 四氢呋喃: 水(含 0.4% HAC) = 77: 3: 20 为流动相, 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL/min 时 DHA 的出峰时间在 10 min 之内, 而且峰形很好。研究表明该方法重现性好, 定量准确, 可作为藻油中 DHA 的定量方法。

参考文献

- 1 Bruerner G. Biological effect of polyunsaturated fatty acid. *Food Sci Technol*, 1992, 53: 631.
- 2 Hung P, Kaku S, Yunoki S *et al.* Dietary effect of EPA rich

and DHA rich fish oils on the immune function of Sprague Dawley rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63: 135-140.

- 3 Ke CY(可成友), Wu XF(吴晓芳). Determination of the contents of unsaturated fatty acid by GC in the meantime. *Chin J Health Lab Technol* (中国卫生检验杂志), 2005, 15: 528-530.
- 4 Xu L(许磊), Zhang LT(张兰桐). The application of Gas chromatography-mass spectrometry in the traditional Chinese medicine. *J Hebei Med Univ* (河北医科大学学报), 2007, 28: 237-240.
- 5 Li H(李宏), Yue CL(岳昌林), Xiang Q(项琪) *et al.* Determination of fatty acids in Brucea jananica oil injection by high-performance liquid chromatography. *Chin JMAP* (中国现代应用药学杂志), 2006, 23: 329-331.
- 6 Ding Y(丁怡), Tang X(唐星). Detection of fatty acid in o-leum coicis by pre-column derivation HPLC. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2004, 24: 249-252.
- 7 Meng DY(蒙缔亚), Ji ZX(冀志霞), Ren LW(任立伟). Determination of linoleic acid in grain by underivatized High Performance Liquid Chromatography. *Anal Test Technol Instrum* (分析测试技术与仪器), 2001, 7(2): 71-74.

(上接第 1057 页)

- 8 Xue PF(薛培峰) *et al.* Chemical constituents from *Potentilla multiflora* L. *Chin Pharm Sci*, 2005, 14(2): 86-88.
- 9 Mahato SB, Sahu NP *et al.* Steroidal alkaloids from solanum khasianum: application of ¹³C NMR spectroscopy to their structural elucidation. *Phytochemistry*, 1980, 19: 2017-

2020.

- 10 Graham JB, *et al.* The synthesis of (25R)-22αN-[15ξ, 17α²H₂]-spiro[5-en-3β-o] [15ξ, 17α²H₂] Solasodine and assignment of the ¹³C N. M. R spectra of solasodine and its derivatives. *Aust J Chem*, 1979, 32: 783-796.