

Determination of DHA-ME in Seaweed Oil by HPLC

Fengshan Cai¹, Lin Zhang^{1,2}, Shikai Wu^{1,2*}

¹Guangdong Key Laboratory of Membrane Materials and Membrane Separation, Guangzhou Institute of Advanced Technology, Chinese Academy of Science, Guangzhou Guangdong

²Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen Guangdong

Email: caifshan@foxmail.com, *sk.wu@giat.ac.cn

Received: Feb. 19th, 2016; accepted: Mar. 6th, 2016; published: Mar. 11th, 2016

Copyright © 2016 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

Abstract

A method was developed for the determination of methyl-DHA in seaweed oil by high performance liquid chromatography (HPLC). The HPLC separation conditions were as follows: an Agilent Eclipse XDB-C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) and elution with acetonitrile-water (v:v = 92:8), UV detection wavelength at 205 nm, 1.0 mL/min of flow rate for mobile phases. On the above conditions, good linearity was found over a concentration range of 10 - 500 μg/mL for methyl-DHA. Linear regression equation was $y = 2.586 \times 10^3x + 5.927 \times 10^3$ ($r^2 = 1$). The average recovery rate was 94.23% (RSD = 7.01%). The average detection of methyl-DHA in seaweed oil was 7.3876 mg/g. This method was simple, rapid and high reproducibility; it can be used for the detection of methyl-DHA in seaweed oil.

Keywords

DHA-ME, Seaweed Oil, HPLC

高效液相色谱法测定海藻油中的DHA甲酯

蔡凤珊¹, 张琳^{1,2}, 吴世凯^{1,2*}

¹广州中国科学院先进技术研究所, 广东省膜材料与膜分离重点实验室, 广东 广州

²中国科学院深圳先进技术研究院, 广东 深圳

Email: caifshan@foxmail.com, *sk.wu@giat.ac.cn

*通讯作者。

文章引用: 蔡凤珊, 张琳, 吴世凯. 高效液相色谱法测定海藻油中的 DHA 甲酯[J]. 生物过程, 2016, 6(1): 17-23.

<http://dx.doi.org/10.12677/bp.2016.61003>

收稿日期: 2016年2月19日; 录用日期: 2016年3月6日; 发布日期: 2016年3月11日

摘要

目的: 建立高效液相色谱法分离测定海藻油样品中的二十二碳六烯酸甲酯(DHA甲酯)含量的方法。方法: 采用Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-水(92:8)溶液为流动相, 流速为1.0 mL/min, 检测波长205 nm。结果: DHA甲酯在10~500 μg/mL的范围内呈良好线性, 线性回归方程为 $y = 2.586 \times 10^3x + 5.927 \times 10^3$ ($r^2 = 1$), 平均回收率为94.23%, 相对标准偏差为7.01%, 海藻油中DHA-甲酯的平均含量为7.3876 mg/g。结论: 本检测方法简便、快速、重现性好, 可用于海藻油样品中DHA甲酯含量的测定。

关键词

DHA甲酯, 海藻油, 高效液相色谱

1. 引言

海藻油是一种从海洋藻类脂肪中精炼而成的纯植物保健食品, 多以不饱和脂肪酸为主[1]-[3]。研究表明, 海藻油中含有较多的 ω -3 系多烯不饱和脂肪酸(PUFA), 包括二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)和二十二碳六烯酸(DHA) [3]-[8]。DHA 是哺乳动物生长、发育和繁殖的必须脂肪酸, 但是难以在体内合成, 主要依赖于鱼油和海藻油的补充摄食[9]-[14]。Ryan 和 Symington 发现海藻油可代替鱼油作为 DHA 的补充来源[14]。与鱼油相比, 海藻油含有的大量植物性 DHA [7], 抗氧化能力强, 结构较稳定, 并且容易被吸收[4]-[6] [10], 是大众喜爱的保健品和营养品。近年来, 随着大众保健意识的增强和对海藻油的进一步认识, 海藻油中 EPA 和 DHA 的开发和应用受到广泛最关注。

目前有关测定油脂中 EPA 和 DHA 的方法较多, Ryan 和 Symington 采用气相色谱法分析样品中人体血液样品中的脂肪酸[14]。许艳萍等采用气相色谱-质谱法测定分析鱼卵鱼油中的脂肪酸组成[15]。蒋跃辉则用毛细管气相色谱法测定鱼油脂肪乳注射液中 DHA 和 EPA 含量[16]。DHA 属于长链脂肪酸, 不易气化, 高温条件对 DHA 的稳定性有很大影响[9] [17], 且气相色谱法稳定性差, 灵敏度欠佳, 衍生重现性略差[15]。高效液相色谱法(HPLC)可以在温和的条件下检测样品 DHA 的含量[18]。晋文慧等采用超高效液相色谱法分析测定了藻油中的 DPA 和 DHA [8]。赵玉生等采用超高效液相色谱法测定油脂中脂肪酸的组成[19]。本试验建立了 HPLC 检测分析海藻油中 DHA 甲酯的方法, 该方法操作简便、分离度良好, 准确度、精密度均符合要求, 可用于油脂样品的 DHA 含量的测定。

2. 仪器与材料

2.1. 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪, AR2140 电子分析天平, RE52CS 旋转蒸发仪, KQ2200 超声波清洗仪, HH-4 数显恒温水浴锅。

2.2. 试剂

DHA-甲酯标准品购自美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈、正己烷等均为色谱纯; 其它试剂均为分析纯。

3. 方法

3.1. 色谱条件

色谱柱: Agilent Eclipse XDB-C₁₈ (150 mm × 4.6mm, 5 μm); 流动性: 乙腈-水(92:8); 检测波长: 205 nm; 流速: 1.0 mL/min, 柱温: 30°C, 进样量: 5 μL。

3.2. 标准样品制备

准确称取 10 mg DHA 甲酯标准样品于 10 mL 容量瓶中, 甲醇定容, 摇匀备用, 所得标准品浓度为 1 mg/mL。

3.3. 样品处理和甲酯化[17]

碱处理: 准确称取海藻油样品 0.2 g 于 50 mL 具塞比色管中, 加入 10 mL 0.5 mol/mL 的 KOH-甲醇溶液振荡, 在 60°C 水浴上加热回流 40 min 至油滴消失, 冷却至室温, 然后加入 10 mL 正己烷, 超声萃取 40 min, 加入 10 mL 去离子水, 摇匀, 静置分层, 取上清液于 3000 r/min 下离心 5 min, 取上清液挥干溶剂, 微孔滤膜过滤后, 取续滤液作为供试品溶液。

酸碱结合处理: 称取海藻油样品 0.2 g, 加入 2 mL 20% 的 KOH-甲醇溶液, 在 70°C 水浴加热 30 min, 取出加入适量的去离子水, 再加入盐酸中和。加 2 mL 正己烷提取, 取出上清液后再用 1 mL 正己烷洗涤一次, 上清液合并、蒸干。再加入 2 mL 1% 硫酸 - 甲醇于 70°C 水浴 30 min, 取出后加入 2 mL 正己烷, 再加蒸馏水至瓶颈, 取出上清液, 再加入 1 mL 正己烷, 洗一次, 合并上清液待测。

酸处理: 称取海藻油样品 0.2 g 加入 2.5 mol/L 硫酸-甲醇 10 mL, 于 70°C 水浴加热 30 min, 加入 2 mL 正己烷提取甲酯化产物, 取出上清, 下层再用 1 mL 正己烷洗涤摇匀, 静置分层, 上清液合并于 3000 r/min 下离心 5 min, 取上清液挥发溶剂, 微孔滤膜过滤后, 取续滤液作为供试品溶液。

4. 结果与分析

4.1. 样品前处理的选择

海藻油样品甲酯化后结果如图 1 所示。

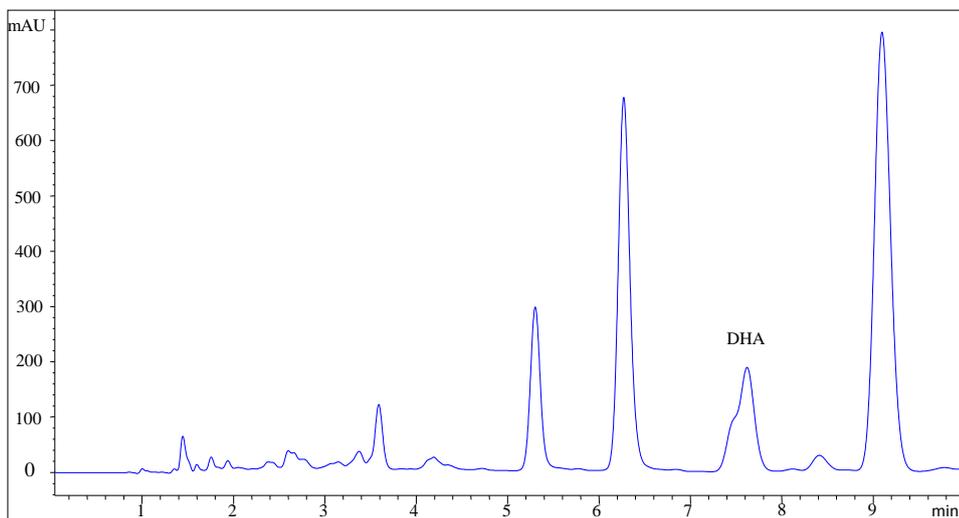
如图 1 所示, 比较图(a)、(b)和(c)可知, 图(a)和图(b)中 DHA 甲酯峰中均有未完全分离的杂质峰; 而图(c), 酸处理后 DHA 甲酯峰与杂质峰能达到基线分离、峰形美观对称, 表明酸处理时 DHA 甲酯的分离度以及响应值的效果最好。由图(c)、(d)和(e)可知, 酸处理条件下改变不同的流动相时发现, 当流动相甲醇-水为 85:15 (V/V)时, 峰形对称美观, 但与杂质峰分离不完全; 当流动相乙腈 - 水为 90:10 (V/V)时 DHA 甲酯峰与杂质峰不能完全分离; 当流动相乙腈-水为 92:8 (V/V)时 DHA 甲酯的分离效果最好, 可获得理想的 DHA 甲酯与杂质达到完全分离的图谱。

4.2. 标准曲线的绘制

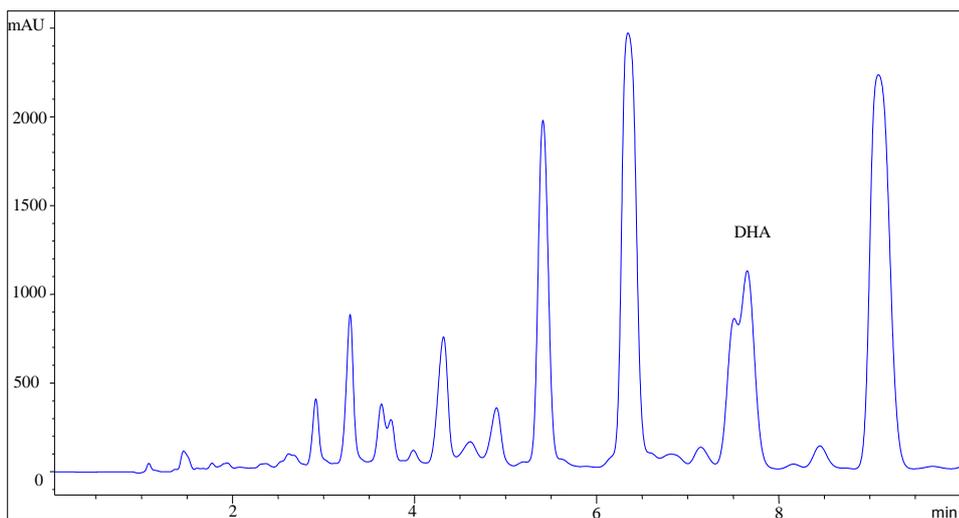
取含 DHA 甲酯不同浓度的标准溶液, 按照 3.1 色谱条件进样, 测定峰面积响应值, 以 DHA 甲酯浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 得到 DHA 甲酯的线性方程。结果表明: $y = 2.586 \times 10^3 x + 5.927 \times 10^3$ ($r^2 = 1$), 线性范围为 10~500 μg/mL。

4.3. 精密度试验

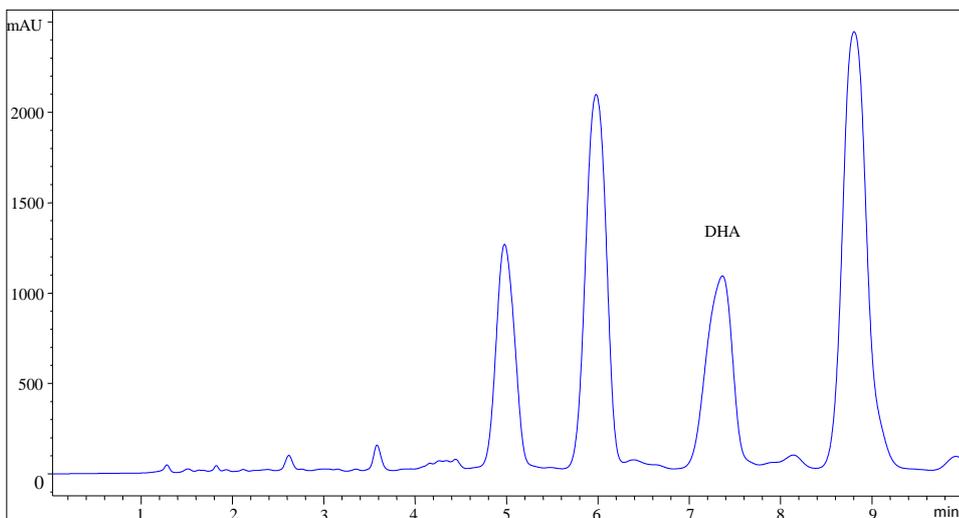
取同一供试品溶液, 按 3.1 色谱条件连续进样 6 次。如表 1 所示, DHA 甲酯峰面积的相对标准偏差为 0.43%, 表明仪器精密度良好。



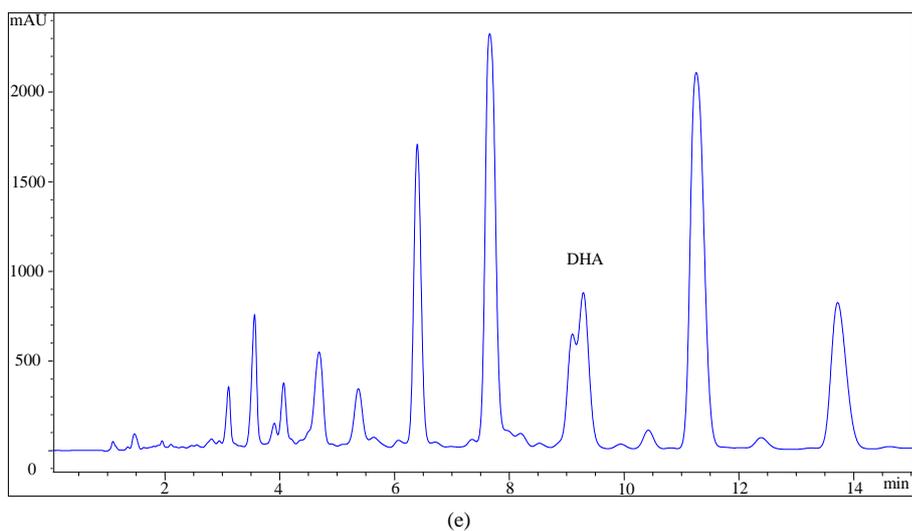
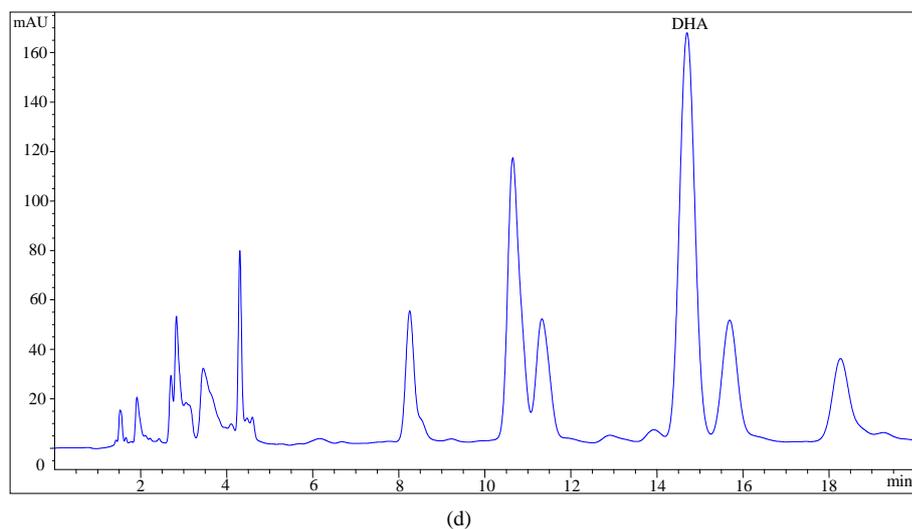
(a)



(b)



(c)



注: (a): 乙腈 - 水(92:8, V/V), 碱处理; (b): 乙腈 - 水(92:8, V/V), 酸碱结合处理; (c): 乙腈 - 水(92:8, V/V), 酸处理; (d): 甲醇 - 水(85:15, V/V), 酸处理; (e): 乙腈 - 水(90:10, V/V), 酸处理。
 Note: (a): Acetonitrile-Water (92:8, V/V), Alkali treatment; (b): Acetonitrile-Water (92:8, V/V), Acid-alkali treatment; (c): Acetonitrile-Water (92:8, V/V), Acid treatment; (d): Methanol-Water (85:15, V/V), Acid treatment; (e): Acetonitrile-Water (90:10, V/V), Acid treatment.

Figure 1. Chromatogram of some samples

图 1. 部分样品色谱图

Table 1. The accuracy, stability and repeatability of HPLC

表 1. 仪器精密度、稳定性和重复性试验

次数	精密度试验			时间 h	稳定性试验			样品	重复性试验		
	峰面积	平均值	RSD (%)		峰面积	平均值	RSD (%)		峰面积	平均值	RSD (%)
1	9392.7			0	9392.7			1	9392.7		
2	9323.2			4	9339.4			2	9323.2		
3	930.0	9364.43 ± 40.154	0.43	8	9373.6	9378.43 ± 21.35	0.23	3	9200.9	9305.73 ± 86.74	0.93
4	9346.5			12	9377.0			4	9203.4		
5	9387.5			16	9398.7			5	9318.3		
6	9416.7			24	9389.2			6	9395.9		

Table 2. Result of sample recoveries

表 2. 样品回收率测定结果

样品中 DHA 甲酯含量(mg)	DHA 甲酯加入量 (mg)	DHA 甲酯测得量 (mg)	DHA 甲酯回收率 (%)	平均值(%)	RSD (%)
0.19872	0.16	0.33726	86.59	94.23 + 6.60	7.01
0.19473	0.16	0.35781	101.93		
0.19665	0.20	0.38182	92.59		
0.19914	0.20	0.37528	88.07		
0.19817	0.24	0.42453	94.32		
0.19345	0.24	0.43814	101.95		

4.4. 稳定性试验

取同一新鲜制备的供试品溶液,按照 3.1 色谱条件,分别在 0、4、8、12、16、24 h 进样分析,记录各自峰面积,计算 DHA 甲酯的峰面积,如表 1 所示,DHA 甲酯峰面积的 RSD 为 0.23%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

4.5. 重复性试验

取同一供试品溶液 6 份,按照 3.1 色谱条件,计算含量,如表 1 所示,DHA 甲酯峰面积的 RSD 为 0.93%,表明此方法重复性较好。

4.6. 加样回收率试验

如表 2 所示,取不同含量的海藻油样品 6 份,加入一定量的 DHA 甲酯后测试,结果表明 DHA 甲酯的加标回收率为 94.23%,RSD 为 7.01%,表明加标回收率良好。与晋文慧等[16]人的结果相比 DHA 甲酯的回收率偏低,可能是因为海藻油样品为粗提样,杂质较多干扰了测试结果。

4.7. 样品测定

取 3 份海藻油样品,分别按照 3.1 色谱条件进行测定,测得海藻油样品的 DHA 甲酯平均含量为 7.3876 mg/g。

5. 结论

本试验采用高效液相色谱法对海藻油中的 DHA 进行分离,使用外标法准确测定 DHA 甲酯的含量。本方法快速准确,分离效果理想,并有较好重现性,为海藻油研究与开发提供一种快速有效的测试方法。

基金项目

深圳市技术创新计划技术开发项目[20140424111431];广东省产学研重点项目[2013B091300015]。

参考文献 (References)

- [1] 蒋晓菲,周红茹,金青哲,等. 海藻油脂制取技术的研究进展[J]. 中国油脂, 2012, 37(10): 62-66.
- [2] 刘圣臣,邹宁,孙杰,等. 小球藻中海藻油的提取工艺研究[J]. 食品科学, 2009, 30(8): 120-123.
- [3] Wang, S., Wang, Q., Jiang, X.M., et al. (2013) Compositional Analysis of Bio-Oil Derived from Pyrolysis of Seaweed. *Energy Conversion and Management*, **68**, 273-280. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2013.01.014>
- [4] 王嵩. 海藻油中分离纯化多烯脂肪酸的研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津大学, 2008.
- [5] López-González, D., Puig-Gamero, M., Ación, F.G., García-Cuadra, F., Valverde, J.L. and Sanchez-Silva, L. (2015)

- Energetic, Economic and Environmental Assessment of the Pyrolysis and Combustion of Microalgae and Their Oils. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **51**, 1752-1770. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2015.07.022>
- [6] Xie, Q.L., Addy, M., Liu, S.Y., *et al.* (2015) Fast Microwave-Assisted Catalytic Co-Pyrolysis of Microalgae and Scum for Bio-Oil Production. *Fuel*, **160**, 577-582. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2015.08.020>
- [7] 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.
- [8] 晋文慧, 陈伟珠, 洪专, 等. 超高效液相色谱法测定藻油中的 DPA 和 DHA[J]. 食品工业科技, 2014, 35(9): 278-281.
- [9] 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.
- [10] 牟志春, 张建树. 毛细管气相色谱法测定进口鱼油保健品中 EPA、DHA 含量[J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2008, 21(16): 332-333.
- [11] 洪滨, 刘会洲. 国内 EPA 及 DHA 研究现状和发展趋势[J]. 过程工程学报, 2006, 19(21): 380-381.
- [12] 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.
- [13] 李庆民, 陈桂范, 高实, 等. 气相色谱外标法测定鱼油中 EPA 和 DHA 的含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 13(14): 259-260.
- [14] Ryan, L. and Symington, A.M. (2015) Algal-Oil Supplements Are a Viable Alternative to Fish-Oil Supplements in Terms of Docosahexaenoic Acid (22: 6n-3; DHA). *Journal of Functional Foods*, **19B**, 852-858.
- [15] 许艳萍, 梁鹏, 陈丽娇, 等. 超临界萃取鱼卵鱼油及其脂肪酸组成的研究[J]. 食品科技, 2015, 40(10): 270-274.
- [16] 蒋跃辉. 毛细管气相色谱法测定鱼油脂肪乳注射液中 DHA 和 EPA 的含量[J]. 中国当代医药, 2012, 19(13): 71-72.
- [17] 寇秀颖, 于国萍. 脂肪和脂肪酸甲酯化方法的研究[J]. 食品研究与开发, 2005, 26(2): 46-47.
- [18] 袁美娟, 薛文通. 高效液相色谱在分析油脂成分方面的应用[J]. 食品科技, 2012, 37(1): 260-263.
- [19] 赵玉生, 陈翔, 王瑛瑶, 等. 超高效液相色谱法测定油脂中脂肪酸的组成与分布[J]. 中国油脂, 2009, 34(5): 64-68.