

# DHA 软胶囊中 3 种特征标志物的测定及其品质评价

杜双有, 宋慧颖, 方 静, 沈文忠, 李福高

(杭州澳医保灵药业有限公司, 浙江 杭州 310018)

**摘要:**针对不同来源的 DHA 软胶囊, 建立一种同时测定其 3 种特征标志物的检测方法, 并结合其他理化指标进行品质的综合评价。建立的特征标志物测定方法为: 样品经甲酯化衍生化处理后, 采用外标法对不同 DHA 软胶囊中 DHA、EPA、亚油酸的甲酯进行检测, 脂肪酸甲酯经换算得到相应脂肪酸的含量。4 个品牌的产品性状、酸价、过氧化值、砷均符合国家相关标准。特征标志物测定的方法学验证结果为: DHA 甲酯、EPA 甲酯及亚油酸甲酯的精密度 RSD 分别为 1.39%、1.43%、0.5%; 线性范围分别为 0.3~2.4 mg/mL、0.2~2.4 mg/mL、0.1~1.6 mg/mL, 相关系数分别为 1.000、0.999 9、1.000, 线性关系均良好; 平均回收率分别为 96.9%~101.4%、97.5%~100.3%、95.4%~99.6%, 准确度较高; 定量限浓度分别为 0.08、0.04、0.03 mg/mL; 24 h 内的稳定性数据 (RSD) 分别为 3.19%、3.65%、3.02%, 说明稳定性好。DHA 软胶囊的评价结果表明: 3# 的酸价较高, 崩解较慢; 2# 的 DHA 和亚油酸含量较低; 0# DHA 软胶囊的亚油酸含量明显高于其他品牌。与其他理化指标相比, 3 种特征标志物在 4 个品牌产品之间差异较明显, 可较好地反应关键品质变化。

**关键词:** DHA; EPA; 亚油酸; 含量测定; 品质

**中图分类号:** TS 227 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-7561(2017)02-0051-05

## Determination of 3 kinds of characteristic markers in DHA soft capsules and its quality assessment

DU Shuang-you, SONG Hui-ying, FANG Jing, SHEN Wen-zhong, LI Fu-gao  
(Hangzhou Aoyipollen Pharmaceutical CO., LTD., Hangzhou Zhejiang 310018)

**Abstract:** A method was established for the simultaneous determination of 3 kinds of characteristic markers in DHA soft capsules from different sources. The other physicochemical indexes were comprehensive assessed. The method was: after methyl esterification and derivatization, the methyl esters of DHA, EPA and linoleic acid in different DHA soft capsules were detected by external standard method, and then the contents of the corresponding fatty acid were obtained by conversion. The product characteristics, acid value, peroxide value and arsenic of 4 samples from different companies were in line with relevant national standards. The results of verification test for the determination of DHA methyl ester, EPA methyl ester and linoleic acid methyl ester were as follows: the precisions were 1.39%, 1.43%, 0.5%; the linear ranges were 0.3~2.4 mg/mL, 0.2~2.4 mg/mL, 0.1~1.6 mg/mL; the correlation coefficients were 1.000, 0.999 9 and 1.000, which showed good linear relationship; the average recovery ranges were 96.9%~101.4%, 97.5%~100.3%, 95.4%~99.6%, respectively, which showed that the method had high accuracy; the concentrations of the limit of quantitation (LOQ) were 0.08, 0.04, 0.03 mg/mL, respectively. The stability data (RSD) within 24 h were 3.19%, 3.65%, 3.02%, which indicated that the sample had good stability. The evaluation results of DHA soft capsule showed that the 3# had

收稿日期: 2016-08-05

基金项目: 农业科研攻关专项(20140432 B109)

作者简介: 杜双有, 1972 年出生, 女, 工程师。

通讯作者: 李福高, 1979 年出生, 男, 高级工程师。

high acid value and slow disintegration, the 2# had low content of DHA and linoleic acid, and the 0# had the highest content of linoleic acid among the samples. Compared with other physicochemical indicators, the difference among 4 brand products on the 3 kinds of characteristic markers were larger and the markers were suitable to reflect the key quality.

**Key words:** DHA; EPA; linoleic acid; content determination; quality

DHA 是人体所必需的脂肪酸,主要来自于海洋鱼类和微藻油<sup>[1-2]</sup>, Boucher 等<sup>[3]</sup>研究证实 DHA 对儿童的记忆力有积极作用。还具有降血压、降血脂、降胆固醇<sup>[4-6]</sup>的保健作用。来源于藻油或鱼油的 DHA,还伴随有 EPA 等脂肪酸。核桃油具有健脑益智,补脑、增加记忆力、促进大脑及神经系统发育的功能,其主要成分是亚油酸,含量超过 50%。核桃油是常见市售植物油中亚油酸含量最高的。DHA 油与核桃油搭配具有极高的辅助改善记忆功能,在 DHA 软胶囊中已有应用。因此,DHA、EPA、亚油酸可作为 DHA 软胶囊的特征标志物。DHA 软胶囊主要成分为油脂,易变质,可引入酸价、过氧化值作为新鲜度指标。众所周知,海洋生物对砷有很强的富集能力,因此,将砷作为 DHA 软胶囊的安全性指标。

当前,国内外 DHA 的主流剂型是软胶囊,来源于藻油或鱼油的产品其处方工艺存在差别,质量参差不齐,因此,建立品质评价方法非常必要。脂肪酸检测有气相色谱法<sup>[7]</sup>、液相色谱法<sup>[8]</sup>、气质联用法<sup>[9]</sup>等方法。目前,虽然藻油或鱼油中 DHA、EPA 的检测方法已有报道,但关于同时测定 DHA 软胶囊的 3 种特征标志物和综合评价 DHA 软胶囊品质的研究未见报道。受产品处方工艺影响,采用 DHA 藻油或动植物油脂检测的相应国家标准<sup>[10-11]</sup>测定 DHA 软胶囊中 3 种特征标志物并非易事,特别是方法回收率低。因此,我们对甲酯化条件和色谱条件进行了大量优化,以外标法对 4 种不同品牌的 DHA 软胶囊进行分析。本文不仅建立和验证了 3 种特征标志物的测定方法,而且结合性状、酸价、过氧化值、砷等理化指标对 DHA 软胶囊品质进行综合评价,有利于进一步推动 DHA 产业的发展。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料与试剂

DHA 软胶囊: 0# DHA 藻油软胶囊(批号 20150312、20150422、20150513), 1# DHA 藻油软胶囊(批号 20150707), 2# 鱼油牛磺酸软胶囊(批号 20150302E), 3# 儿童鱼油胶囊(批号 268672)。

二十二碳六烯酸甲酯( $C_{22}H_{34}O_2$ ): 美国 NU - CHEK, 纯度 > 99%; 二十碳五烯酸甲酯( $C_{21}H_{32}O_2$ ): 美国 NU - CHEK, 纯度 > 99%; 亚油酸甲酯: 阿拉丁, 纯度 > 99%。

氯化钠、无水硫酸钠、异辛烷、甲醇、沸石、乙醚、乙醇、碘化钾、氢氧化钠、氢氧化钾、硼氢化钾、硫脲、盐酸、硝酸、硫酸、高氯酸、氧化镁、抗坏血酸、酚酞指示剂、淀粉指示剂、硫代硫酸钠、三氯甲烷、冰醋酸: 均购自国药集团化学试剂有限公司。砷标准储备液: 国家化学试剂质检中心。

### 1.2 仪器与设备

气相色谱仪 7890A: 安捷伦科技有限公司; AFS - 930 原子荧光光度计: 岛津公司; WX - 8000 微波消解仪: 上海屹尧仪器科技发展有限公司; XPE - 205 电子天平: 梅特勒—托利多国际股份有限公司; 马弗炉和水浴锅: 上海精宏实验设备有限公司; 智能磁力搅拌器: 巩义予华仪器 ZNCL - GS。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 常规理化指标测定方法

感官指标中色泽、气味、滋味的测定,酸价(以 KOH mg/g 计)的测定以及过氧化值的测定: 均参照 GB/T 5009.37—2003《食用植物油卫生标准的分析方法》。有害金属指标总砷的测定: 参照 GB/T 5009.11—2003《食品中总砷及无机砷的测定》。崩解时限检测: 按《中华人民共和国药典》2015 年版第四部 <0921> 的方法。

#### 1.3.2 特征标志物测定方法的建立和验证

本文以《GBT 17376—2008 动植物油脂 脂肪酸甲酯制备》和《GBT 17377—2008 动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析》为基础,通过大量优化 DHA 软胶囊的衍生化方法以及色谱条件,选择分析时间短、分离度好、抗干扰能力强的分析方法。

##### 1.3.2.1 初步建立的特征标志物测定方法

称取 DHA 软胶囊内容物约 400 mg 于 50 mL 圆底烧瓶,加入氢氧化钠甲醇溶液 4 mL,水浴上磁力搅拌并回流。回流之前通入氮气 3 min,接上冷凝管回流 30 min,用移液管从冷凝器顶部加入 7 mL 三氟

化硼甲醇溶液于沸腾溶液中,继续回流 15 min。加入 5 mL 异辛烷于沸腾溶液,取下冷凝管,加入氯化钠饱和溶液 20 mL,振摇 1 min。将回流液加入分液漏斗进行萃取,取上部有机相。底部水相,再加入 5 mL 异辛烷,进行二次萃取。合并萃取液,加少量无水硫酸钠,振摇后静置,取上清液,用异辛烷适当稀释后进行测定。

气相色谱条件:色谱柱,安捷伦 HP-INNOWAX 毛细管柱(30 m × 0.25 mm × 0.5 μm);进样量 1 μL;采用程序升温,初始温度 170 °C,保持 2 min,以 5 °C/min 升温至 240 °C,保持 10 min;进样口温度 200 °C;FID 检测器温度 260 °C;分流比 50:1;氮气流量为 40 mL/min。

### 1.3.2.2 特征标志物测定方法的验证

#### (1) 线性方程

称取适量 DHA 甲酯标准品、EPA 甲酯标准品、亚油酸标准品,分别配制成 0.3、0.6、1.2、1.8、2.4 mg/mL DHA 甲酯溶液,0.2、0.4、0.8、1.6、2.4 mg/mL EPA 甲酯溶液,和 0.1、0.4、0.8、1.2、1.6 mg/mL 亚油酸溶液。DHA 甲酯、EPA 甲酯、亚油酸甲酯在相应的浓度范围内均与其峰面积呈线性关系,线性方程分别为  $Y = 337.82X + 0.3023$ 、 $Y = 380X + 8.3322$ 、 $Y = 583.33X + 4.2323$ ,线性相关系数分别为 1.000、0.9999、1.000。

#### (2) 精密度

称取 0# DHA 藻油软胶囊内容物按 1.3.2.1 进行样品处理,各取 1 μL 进样,平行进样 6 次,测得 DHA、EPA、亚油酸含量的相对标准偏差分别为 1.39%、1.43%、0.5%,表明该色谱条件下精密度良好。

#### (3) 准确度

采用加样回收率法,在已知 DHA、EPA、亚油酸含量的样品中加入 1 mL 的 1 mg/mL DHA 甲酯溶液、0.1 mL 的 1 mg/mL EPA 甲酯溶液和 0.85 mL 的 1 mg/mL 亚油酸甲酯溶液,然后按样品测定方法预处理后进样分析,得 DHA 回收率为 96.9% ~ 101.4%,EPA 回收率为 97.5% ~ 100.3%,亚油酸回收率为 95.4% ~ 99.6%。因此,本方法完全满足分析要求。

#### (4) 定量限

分别移取适量 DHA 甲酯、EPA 甲酯、亚油酸甲酯标准溶液,用异辛烷逐渐稀释后进样,直至三者的气相色谱图的信噪比约为 10:1,即得定量限。DHA 甲酯、EPA 甲酯、亚油酸甲酯的定量限浓度分别为

0.08、0.04、0.03 mg/mL。

#### (5) 样品的溶液稳定性

称取适量 DHA 藻油软胶囊内容物,按 1.3.2.1 处理。将样品在室温下分别放置 0、2、4、6、24 h,取样测定。在 24 h 内,DHA 甲酯、EPA 甲酯、亚油酸甲酯相应峰面积的 RSD 分别为 3.19%、3.65%、3.02%,均小于 10%,符合规定。因此,说明供试品溶液在常温状态下短期放置其脂肪酸未产生明显分解。

## 2 结果与分析

### 2.1 色谱柱的选择

DHA、EPA 和亚油酸均为脂肪酸。参考有关资料,本实验分别筛选了安捷伦 DB-WAX、HP-INNOWAX 色谱柱,实验结果表明 HP-INNOWAX 色谱柱分离效果好、分析时间短,适合 DHA 软胶囊 3 种特征标志物的分析检测,色谱图见图 1。在该色谱柱下,DHA 甲酯、EPA 甲酯、亚油酸甲酯的保留时间分别为 24.1、18.2、12.9 min。

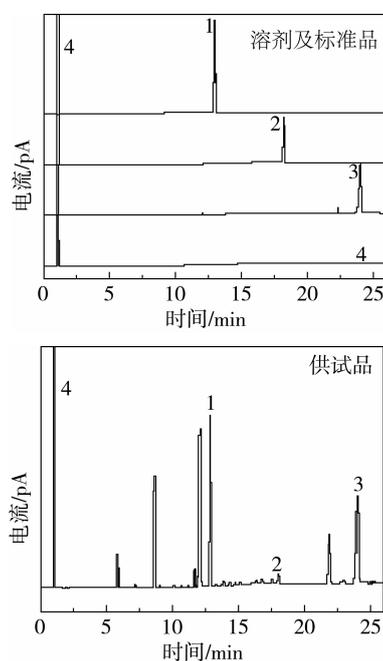


图1 气相色谱图

注:1,亚油酸甲酯;2,EPA 甲酯;3,DHA 甲酯;4,异辛烷。

### 2.2 萃取次数对结果的影响

DHA 甲酯在衍生化结束后需用异辛烷萃取,本实验考察了异辛烷萃取次数对实验结果的影响。实验结果采用外标法,得出萃取一次,DHA 萃取率为 70.8%;萃取两次,DHA 萃取率约为 99.2%,萃取率明显提高;萃取三次,DHA 萃取率约为 99.6%,与萃取 2 次结果并无显著差异。因此,确定萃取 2 次合适。EPA 甲酯和亚油酸甲酯与 DHA 甲酯相似,确

定萃取2次较佳。

### 2.3 气相色谱分流比对结果的影响

当进样量为1 μL时,需改变分流比以达到较好的分离效果。当分流比为10:1时,色谱柱超载;分流比为50:1时,色谱峰强度适中,可用于样品的分析,因此最终确定分流比为50:1。同时,实验过程中发现分流比对亚油酸等成分具有较大的分流歧视现象,故对于含量测定采用外标法比国家标准中的面积归一法准确性更高。

### 2.4 皂化和甲酯化的试剂用量和时间

氢氧化钠甲醇溶液和三氟化硼甲醇溶液的用量在反应过程中直接影响甲酯化的速度和程度。本实验考察了不同试剂用量与反应时间对结果的影响:分别设定氢氧化钠甲醇溶液3、4、5、6 mL,三氟化硼甲醇溶液5、6、7、8 mL,皂化时间10、20、30、60 min,甲酯化时间5、10、15、20 min,得出适当延长皂化反应时间对整个甲酯化过程影响较大。以GB/T 17376为基础,经预实验和单因素对比实验优化,得出最佳衍生化条件为:氢氧化钠甲醇溶液4 mL,三氟化硼甲醇溶液7 mL,皂化反应时间30 min,甲酯化时间15 min。

### 2.5 氮气保护时间

作为不饱和脂肪酸,DHA含有6个碳碳双键,

双键含孤电子对,极不稳定,极易被氧化,实验过程中要用氮气保护,防止在皂化、甲酯化过程中DHA被氧化。从表1可以看出,回流之前通入氮气3 min与6 min差别不大,通入氮气可以显著提高DHA甲酯的含量,故选用3 min的通氮时间。

表1 氮气保护对DHA软胶囊3种特征标志物含量的影响(n=3)

通氮时间 /min	DHA		EPA		亚油酸	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
0	19.29	1.85	2.01	2.80	17.43	1.88
3	23.15	1.38	2.11	2.97	17.36	2.16
6	23.34	2.26	2.10	2.54	17.51	2.05

### 2.6 不同品牌DHA软胶囊的理化指标

从表2可看出,3#儿童鱼油胶囊,酸价和过氧化值较高、崩解时限较长。从软胶囊壳硬度来看,3#儿童鱼油胶囊硬度最大。1#DHA藻油软胶囊有较明显腥味,可能是软胶囊内容物部分物质迁移出软胶囊壳引起的。所测DHA软胶囊的酸价均低于1 KOH mg/g、过氧化值均低于0.1 g/100 g,符合《GB 15196—2015 食品安全国家标准 食用油脂制品》的要求。

表2 不同品牌产品的理化指标比较

名称	批号	色泽	气味	酸价/(KOH mg/g)	过氧化值/(g/100 g)	砷/(mg/kg)	崩解时限/min
0#藻油软胶囊	20150312	淡黄色至橙色	无明显异味	0.58	0.06	0.53	39
0#藻油软胶囊	20150422	淡黄色至橙色	无明显异味	0.57	0.05	0.57	36
0#藻油软胶囊	20150513	淡黄色至橙色	无明显异味	0.54	0.06	0.54	40
1#DHA藻油软胶囊	20150707	淡黄色透明	有腥味	0.41	0.05	0.68	20
2#鱼油牛磺酸软胶囊	20150302E	棕色不透明	无明显异味	0.76	0.07	0.46	35
3#儿童鱼油软胶囊	268672	淡黄色透明	无明显异味	0.92	0.09	0.53	55

DHA主要从海洋生物中提取,而海洋生物对砷有很强的富集能力,并且砷是一种毒性很强的元素,因此对产品中砷含量应有限制。由表2可知,4个品牌的DHA软胶囊砷含量均低于1 mg/kg,符合《GB 16740—2014 食品安全国家标准 保健食品》的要求。

### 2.7 特征标志物的结果与分析

称取各品牌DHA软胶囊内容物适量,按1.3.2.1分别处理。进样1 μL,所得色谱图如图2所示。因对照品为脂肪酸甲酯,而计算结果以游离酸表示,所以DHA、EPA和亚油酸的含量需根据分子量比值(酸/酯)进行换算,换算系数分别为0.959 1、

0.955 8、0.952 0。不同来源的软胶囊内 DHA、EPA、亚油酸含量如表 3 所示。

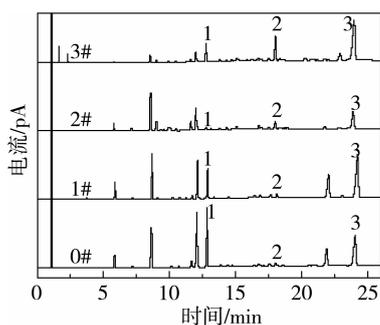


图 2 不同品牌 DHA 软胶囊的色谱图

注:1,亚油酸甲酯;2,EPA 甲酯;3,DHA 甲酯。

表 3 不同品牌 DHA 软胶囊的 3 种特征标志物含量 (n=3) %

名称	批号	DHA		EPA		亚油酸	
		含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
0#DHA 藻油软胶囊	20150312	24.05	1.25	2.13	2.79	17.23	1.48
0#DHA 藻油软胶囊	20150422	23.81	1.97	2.12	3.01	17.02	1.36
0#DHA 藻油软胶囊	20150513	23.96	2.34	2.08	2.26	17.14	1.97
1#DHA 藻油软胶囊	20150707	25.61	1.56	1.94	3.68	7.28	2.35
2#鱼油牛磺酸软胶囊	20150302E	11.40	1.43	6.08	2.82	0.81	2.56
3#儿童鱼油胶囊	268672	28.01	2.24	18.02	2.61	5.87	2.67

从表 3 可以看出,来源于藻油的 DHA 软胶囊,其 EPA 含量明显低于来源于鱼油的产品。0# DHA 藻油软胶囊是所有品牌中亚油酸含量最高的。本次实验所测产品中 DHA 含量最大值是最小值的 2.46 倍,由此可见,市场上 DHA 软胶囊的质量参差不齐。

藻油主要来源于海洋藻类,含极少量的 EPA;而鱼油的 EPA 含量较高。DHA 主要消费人群是婴幼儿和孕妇,研究表明过量的 EPA 会对人多血管发育造成损害。藻类的 DHA 含量高,EPA 含量低,且

容易吸收,是补充 DHA 的理想产品。另外,0#DHA 藻油软胶囊中的亚油酸含量达 17% 左右,主要来源于产品中添加的核桃油。

### 3 结论

本文所测 4 个品牌的 DHA 软胶囊,其气味、酸价、过氧化值、砷,基本接近,符合相关国家标准。与其他理化指标相比,3 种特征标志物含量在 4 个品牌产品之间存在较明显差异,可较好地反映关键品质变化。特征标志物测定方法经线性、精密性、回收率、定量限、稳定性的方法学验证,确定该分析方法可靠、重现性好,可用于不同 DHA 软胶囊中 DHA、EPA 和亚油酸的含量测定。本文对不同品牌 DHA 软胶囊的品质进行综合评价,可为 DHA 软胶囊产业的发展提供参考。

### 参考文献:

[1]汪秋安. EPA 和 DHA 的开发与应用[J]. 粮油食品科技, 1998 (3):16-17.

[2]张秋会. 海洋微藻粗脂肪、EPA 和 DHA 含量的测定[J]. 粮油食品科技, 2006,14(2):48-49.

[3]Boucher O, Burden M J, Muckle G, et al. Neurophysiologic and neurobehavioral evidence of beneficial effects of prenatal omega-3 fatty acid in take on memory function at school sga[J]. Am J Clin Nutr, 2011, 93(5): 1025-1037.

[4]Morit A, Bao D Q, Burke V, et al. Docosahexaenoic acid but not eicosapentaenoic acid lowers smlulatoryblood pressure and rate in humans [J]. Hypertension, 1999, 34: 253-260.

[5]Umamura K, Toshima Y, Asai F, et al. Effect of dietary docosaexaenoic acid in the rat middle cerebralartery thrombosis model [J]. Thrombodid Res, 1995, 78(5): 379-387.

[6]雷霆,郝希成. 多烯脂肪酸(EPA 和 DHA)的制备分布及生理作用[J]. 粮油食品科技, 1993(1):25-29.

[7]雷霆,郝希成. 鱼油及其多烯脂肪酸的制备研究 I 气相色谱法快速测定鱼油及其制品中的 EPA、DHA 含量[J]. 粮油食品科技, 1995(1):14-15.

[8]李一哲,包桂蓉,王华. 超高效液相色谱法测定生物柴油中的 11 种脂肪酸及脂肪酸甲酯[J]. 色谱, 2008, 26(4): 494-498.

[9]钱宗耀,曹晓倩,王成. 气质联用法分析鱼油胶囊中脂肪酸组成[J]. 粮油食品科技, 2014,22(6): 44-53.

[10]GB/T 17376-2008,动植物油脂 脂肪酸甲酯制备[S].

[11]GB/T 17377-2008,动植物油脂 脂肪酸甲酯的气相色谱分析[S].