

# 海洋微藻中脂肪酸的气相色谱分析

蔡阿根 郑爱榕 李文权  
廖启斌 陶瑞军 陈清花

(厦门大学, 厦门 361005)

## 摘 要

本文以正十九碳酸 ( $C_{19:0}$ ) 作内标, 用  $HCl-CH_3OH$  对海洋微藻 (三角褐指藻) 进行抽提酯化后做毛细管气相色谱分析。方法的重现性各脂肪酸的相对偏差为  $0.3\% \sim 11.6\%$ , 回收率为  $85.7\% \sim 103.3\%$ , 仪器稳定性的相对偏差为  $0.2\% \sim 3.1\%$ 。

关键词 海洋微藻 脂肪酸 气相色谱

## 1 引言

高度不饱和脂肪酸 (PUFA) 特别是长链  $\omega-3$ -PUFA 如 DHA 和 EPA 具有很高的营养价值和药用价值已广为人知。PUFA 主要存在于海洋微藻和海产鱼油中。微藻是海洋中的生产力, 具有合成 PUFA 的特异功能, 鱼只有通过吞食微藻才得以在体内积累 PUFA。藻体内 EPA 和 DHA 的相对含量远比鱼油高, 且从藻细胞提取的 PUFA 产品没有腥味, 不含胆固醇, 避免了服用鱼油胶囊摄入大量的胆固醇的缺点。此外, 微藻还具有生长周期短, 繁殖速度快, 可塑性强, 对营养要素要求简单等特点。因此, 利用微藻生产 PUFA 正愈来愈引起科学工作者的关注。而快速简便、准确地测定微藻中的 PUFA 对加快和促进从微藻中提取 PUFA 的研究有着现实的意义。

本实验拟将微藻中脂肪酸的抽提和酯化一步化, 使样品的预处理简单、快速, 旨在为从微藻中提取 PUFA 的研究和微藻中 PUFA 的分析提供一种新的简易快速的方法。

## 2 材料和方法

### 2.1 样品和试剂

实验选用的微藻为三角褐指藻 (*Phaeodactylum tricornutum*), 该藻由厦门大学生物系提供。培养液采用 f/2 配方, 光强为  $4 \times 30W$  的荧光灯, 亮暗比为 12/12, 温度  $18^\circ C$ 。实验所用的试剂均为国产分析纯。

### 2.2 标准脂肪酸甲酯的制备

准确移取各标准脂肪酸于 10ml 带螺帽的水解管中,用 N<sub>2</sub> 将溶剂吹干后,加入 2ml 的 2mol/L 的 HCl-CH<sub>3</sub>OH 溶液充 N<sub>2</sub> 后密封,置于 100℃ 水浴中酯化 40min,冷却后加入 2ml 正己烷(分两次)提取各标准脂肪酸甲酯。提取液转移入 5ml 锥形具塞离心管中,用 N<sub>2</sub> 吹干后,加入 0.2ml 正己烷溶解后供色谱分析。

### 2.3 样品的水解和甲酯制备

准确移取一定体积的处于指数生长期的藻液(须先测其光密度 O<sub>D</sub>680,然后由藻光密度与藻干重关系曲线换算成藻重量),过滤后转移到 10ml 带螺帽的水解管中,加入内标和 2mol/L 的 HCl-CH<sub>3</sub>OH 溶液 2ml 后按(2.2)中的方法水解样品和制备脂肪酸甲酯。

### 2.4 气相色谱分析

实验所用气相色谱仪为 SP-3420 型(北京分析仪器厂产品),色谱柱为 SE-54 弹性石英毛细管柱(30m×0.22mm),载气为 N<sub>2</sub>,流速为 30ml/min,分流比 18:1,升温程序:15℃~180℃(4min)<sup>3℃/min</sup>→210℃(10min)<sup>4℃/min</sup>→280℃(20min),进样量 1μl。

### 2.5 定性分析

在同一色谱条件下,用已知的脂肪酸甲酯标样(自制的标准和上海水产大学食品科学技术系混合脂肪酸甲酯标准)色谱峰的保留时间与样品脂肪酸甲酯组分色谱峰的保留时间对照进行分析。此外还参考其他研究者的结果<sup>[4]</sup>及利用脂肪酸的碳数规律<sup>[5]</sup>进行综合分析。

### 2.6 定量分析

采用内标法测定微藻中的脂肪酸含量。各脂肪酸组的含量(μg/g)干重计算公式如下:

$$W_i(\%) = RRF \times \frac{A_i}{A_s} \times \frac{W_s}{W} \times 100\% \dots\dots\dots (1)$$

式中 W<sub>i</sub> 为样品组分 i 的重量; A<sub>i</sub> 为样品组分 i 的峰面积; A<sub>s</sub> 为所加内标物的峰面积; W<sub>s</sub> 为所加内标物的重量; W 为样品重量; RRF =  $\frac{A_i}{W_i} \times \frac{A_s}{W_s}$ , 为组分 i 与所加内标物的相对校正因子。

## 3 结果与讨论

### 3.1 脂肪酸色谱图

各标准脂肪酸的气相色谱图和各脂肪酸甲酯的保留时间及校正因子分别见图 1 和表 1。图 2 是三角褐指藻的脂肪酸气相色谱图,由图 2 可知,可鉴定出的脂肪酸有 C<sub>14:0</sub>、C<sub>16:3</sub>、C<sub>16:5</sub>、C<sub>16:6</sub>、C<sub>18:3</sub>、C<sub>18:1</sub>、C<sub>18:6</sub>、C<sub>20:2</sub> 和 C<sub>22:6</sub> 等,这与前人的研究结果是相一致的。从谱图来看,各脂肪酸甲酯峰的分离是清楚的,说明分离度好。

表 1 各脂肪酸甲酯的保留时间和校正因子

脂肪酸名称	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:0</sub>	C <sub>26:0</sub>
保留时间 (min)	24.232	30.009	34.268	34.798	38.624	42.301	52.567
校正因子	0.945	0.795	2.407	0.779	2.065	0.932	5.10

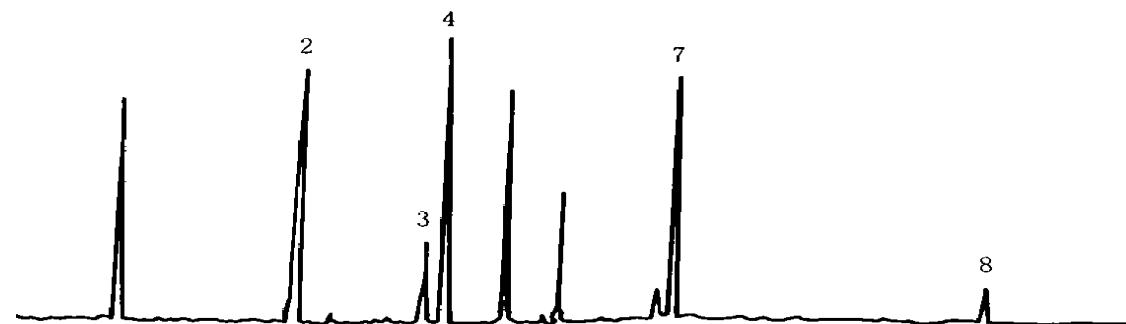


图 1 标准脂肪酸气相色谱图

1. C<sub>14:0</sub> 2. C<sub>16:0</sub> 3. C<sub>18:1</sub> 4. C<sub>18:0</sub> 5. C<sub>19:0</sub> 6. C<sub>20:0</sub> 7. C<sub>22:0</sub> 8. C<sub>26:0</sub>

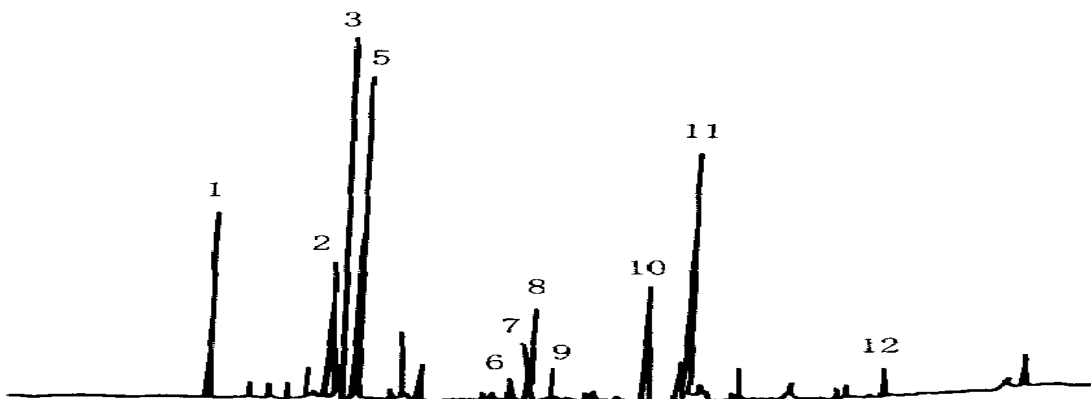


图 2 三角褐指藻脂肪酸气相色谱图

1. C<sub>14:0</sub> 2. C<sub>16:2+4</sub> 3. C<sub>16:1+7</sub> 4. C<sub>16:1</sub> 5. C<sub>16:0</sub> 6. C<sub>18:2+6</sub>  
7. C<sub>18:1+9</sub> 8. C<sub>18:1+7</sub> 9. C<sub>18:0</sub> 10. C<sub>19:0</sub> 11. C<sub>20:3+3</sub> 12. C<sub>22:6+3</sub>

表 2 方法重复性试验结果 (单位:  $\mu\text{g/g}$  干重)

脂肪酸名称	样品 1	样品 2	平均值	标准偏差	相对偏差
C <sub>14:0</sub>	0.5443	0.5120	0.5282	0.0228	4.3
C <sub>16:2+4</sub>	1.2095	1.3332	1.2714	0.0875	6.9
C <sub>16:1+7</sub>	7.0465	7.2186	7.1326	0.1217	1.7
C <sub>16:1</sub>	0.5210	0.5664	0.5437	0.0321	5.9
C <sub>16:0</sub>	1.2068	1.2126	1.2097	0.0041	0.3
C <sub>18:2+6</sub>	0.3957	0.4295	0.4126	0.0239	5.8
C <sub>18:1+9</sub>	0.9161	0.9355	0.9258	0.0137	1.5
C <sub>18:1+7</sub>	0.155	0.1558	0.1554	0.0005	0.3
C <sub>18:0</sub>	0.1227	0.1142	0.1187	0.0057	4.8
C <sub>20:3+3</sub>	2.9619	3.4890	3.2250	0.3727	11.6
C <sub>22:6+3</sub>	0.3096	0.3394	0.3244	0.0211	6.5

### 3.2 方法的平行性试验

为进一步检验样品从过滤、水解至抽提酯化和色谱分析整个过程的可靠性,进行平行性试验。结果见表 2,除 C<sub>20:3</sub>外,其余脂肪酸的相对偏差均低于 7%,表明方法重复性较好,所建立的方法是可靠的。

### 3.3 回收率试验

在同一份样品中加入不同量的标准脂肪酸按上述方法测试,结果见表 3,回收率在 85.7% ~ 103.3% 之间,可见回收率较高且稳定。

表 3 回收率试验结果 (单位:  $\mu\text{g}$ )

脂肪酸	加入值	测量值	回收率 (%)	加入值	测量值	回收率 (%)
C <sub>14:0</sub>	201.6	201.7	100.0	73.6	72.6	98.6
C <sub>16:0</sub>	201.2	201.9	100.3	76.0	65.1	85.7
C <sub>18:0</sub>	101.0	103.2	102.2	77.6	72.2	93.0
C <sub>18:1</sub>	220.0	221.8	100.8	40.0	35.4	88.5
C <sub>18:2</sub>	186.0	188.2	101.2	-	-	-
C <sub>20:0</sub>	202.0	204.1	101.0	79.2	79.8	100.8
C <sub>22:0</sub>	200.0	205.3	102.7	90.4	89.4	98.9
C <sub>26:0</sub>	-	-	-	92.0	95.0	103.3

### 3.4 仪器稳定性试验

将同一份标准脂肪酸甲酯样品,在相同条件下,重复进样 3 次,进行仪器稳定性试验,结果见表 4,对所测定的脂肪酸其相对偏差均小于 3%,说明测试技术是可靠的。

表 4 仪器测定的试验 (单位:  $\mu\text{g}$ )

	C <sub>14:0</sub>	C <sub>16:0</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>	C <sub>20:0</sub>	C <sub>22:0</sub>
第一次进样	208.7	203.7	103.1	219.7	188.3	204.9	207.9
第二次进样	200.2	200.7	103.4	224.3	189.5	203.1	203.7
第三次进样	196.1	201.4	103.2	221.3	186.9	204.3	204.3
平均值	201.7	201.9	103.2	221.8	188.2	204.1	205.3
标准偏差	6.43	1.57	0.22	2.34	1.30	0.92	2.27
相对偏差 (%)	3.1	0.8	0.2	1.1	0.7	0.4	1.1

### 3.5 实验关键

(1) 内标物的选择: 作为内标物应满足的条件是能与样品组分峰分离,与样品组分性质相似,能经历样品预处理的全过程,样品本身不含内标物组分或者很微量。由于海洋微藻中不含 C<sub>19:0</sub>,因此,本实验选择 C<sub>19:0</sub> 作为内标物。

(2) 洁净处理: 由于所用微藻样品量小,所含脂肪酸含量相对较低,为保证测定的准确度,应避免有机物沾污。因此,实验所用的玻璃仪器和有关的用具均应进行超声清洗,或者高温灼

烧 ( $500^{\circ}\text{C}$ , 2~4h), 或者用洗液浸泡洗净后用浸泡于 1N  $\text{HNO}_3$  中于用前洗净烘干。

(3) 内标法定量: 由于样品中加入了内标物, 因此, 如果在处理过程中样品部分损失或进样量不准确均不会影响定量结果。因为从 (1) 式可知, 样品中脂肪酸含量与进样量无关, 只与所加内标量有关, 因此样品水解抽提酯化后无需准确定容。

(4) 水解管的密封: 样品的抽提酯化这一步要注意水解管的密封, 避免溶剂挥发。本实验采用聚四氟乙烯材料密封, 效果良好。

## 4 结论

本文建立的海洋微藻中脂酸的气相色谱分析方法, 各脂肪酸的分离度高, 重现性好 (相对偏差 0.6%~11.6%), 回收率高而稳定 (85.7%~103.3%), 仪器测试稳定性高 (相对偏差 0.2%~3.1%), 技术可靠。该法简便 (抽提酯化一步完成)、快速 (几个小时就可得到结果)、样品量少 (约十几毫克), 可为大批量分析海洋微藻中的脂肪酸, 开发利用海洋微藻资源, 为海洋微藻化学的研究, 提供一种新的方法。

## 参考文献

- 1 姜恒等. 利用海洋微藻培养生产  $\omega-3$  多不饱和脂肪酸. 海洋科学, 1997(6): 18~20
- 2 刘发义等. 海洋微藻高度不饱和脂肪酸的研究和开发. 全国首届海洋生命活性物质与天然药物学术讨论会论文集, 厦门, 1996, 269~273
- 3 蔡春等. 海藻脂肪酸的气相色谱分析. 湛江水产学院学报, 1993, 13(1): 49~52
- 4 王大志. 硒锗对几种微藻的生理生化效应及微藻生化的研究. 厦门大学博士论文, 1997
- 5 高鸿等. 仪器分析. 南京: 江苏科学技术出版社, 1987, 354
- 6 王唯玮. 海产油脂中心血管活性物质—高度不饱和脂肪酸的提取分离技术和应用. 中国海洋药物, 1989, 31(3): 30~40

# Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid in Microalgae

Cai Agen Zheng Airong Li Wenquan Liao Qibin Tao Ruijun Chen Qinghua

(Xiamen University, Xiamen 361005)

## Abstract

A capillary column gas chromatographic technique for the determination of microalgae (*phaeodactylum tricornutum*) fatty acids has been developed. The fatty acid extraction and esterification is finished in one step. Eleven kinds of fatty acid methyl esters have been identified. The CV is less than 7% except  $\text{C}_{22:5\omega3}$  and the recovery rate 85.7~103.3%. Thus a rapid, convenient, reliable and microanalytical method is established for the study on developing and making use of microalgae.

**Key words** microalgae, fatty acid, gas chromatography