

文章编号:1671-1513(2011)05-0025-05

藻粉中亚油酸 GC 测定的预处理方法研究

李金穗, 汪 苹, 李奥博

(北京工商大学 食品学院, 北京 100048)

摘 要: 亚油酸作为一种新兴保健油脂受到越来越多的关注. 研究了气相色谱法测定异养小球藻藻粉中亚油酸的预处理方法. 通过单因素实验和正交试验, 确定了优化工艺参数. 结果表明: GC 测定藻粉中亚油酸的优化预处理方法为酸催化甲酯化法, 选用 2 mL 体积比为 1:1 的正己烷/异丙醇溶液为提取剂, 提取时间 1 h, 加入 3 mL 体积分数为 2% 的 H_2SO_4 -甲醇溶液甲酯化, 1 mL 乙醚萃取. 优化产率为 3.00 mg/g.

关键词: 异养小球藻; 亚油酸; 气相色谱; 预处理

中图分类号: TS224.4

文献标志码: A

近年来, 人们发现食用较多油脂会造成高血脂、高胆固醇、肥胖、糖尿病等为消费者所顾虑的不良影响. 由此国外相继开发出一大类新型保健型油脂, 其功能主要有降胆固醇、降血脂、减肥、抗癌等保健作用, 其中的主要功效成分即为多不饱和脂肪酸(PUFA): 亚油酸(LA)、亚麻酸(LNA)、花生四烯酸(AA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)、磷脂及现在新兴起的结构油脂等^[1]. LA 是最早被确认的必需脂肪酸和重要的多不饱和脂肪酸^[2]. 研究表明, LA 可维持体内细胞膜完整, 控制细胞新陈代谢, 降低胆固醇水平, 预防和治疗心脑血管疾病等^[3].

小球藻藻粉含有丰富的 LA, 由于 LA 沸点较高, 通过气相色谱定量测定时需要进行甲酯化, 降低汽化温度, 因此藻粉中 LA 的提取条件及甲酯化条件对 LA 含量的测定结果有很大影响. 尽管从玉米中提取测定 LA 有较多的文献报道, 但从藻粉中高效提取测定 LA 的研究尚不多见, 因此有必要对藻粉中 LA 的 GC 测定预处理方法进行研究探索.

本实验在碱酸催化酯化法的基础上, 通过对藻粉提取溶剂、亚油酸甲酯的萃取溶剂和酯化方法的优化, 为藻粉中 LA 的 GC 测定提供更好的测定

方法.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

小球藻 FACHB-270, 购自中科院武汉水生生物研究所, 通过异养培养收获藻细胞, 离心冻干制备成藻粉.

LA、亚油酸甲酯标样(Sigma), 正己烷、乙醚、石油醚、甲醇、硫酸、异丙醇、氢氧化钾均为分析纯.

1.2 仪器与设备

HH2SH24 型电热恒温水浴锅, 北京长安科学仪器厂; TGL-16G 型高速离心机, 上海安亭科学仪器厂; VARIAN CP-3800 型气相色谱仪, 美国 Varian.

1.3 实验方法

藻粉中 LA 的 GC 测定预处理步骤为: 1) 从藻粉中提取 LA; 2) LA 的甲酯化; 3) 用萃取剂将亚油酸甲酯萃取至有机层; 4) GC 测定亚油酸甲酯. 实验流程见图 1.

图 1 LA 的 GC 测定预处理流程

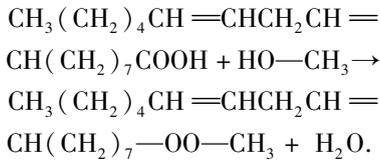
Fig. 1 Flow chart on GC determination pretreatment of LA

收稿日期: 2011-06-02

作者简介: 李金穗, 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻生物技术研究;

汪 苹, 女, 教授, 主要从事水污染控制工程方面的研究. 通讯作者.

其中,亚油酸甲酯化过程反应式如下:



1.3.1 LA 的 GC 测定预处理步骤

初步选用酸碱甲酯化法从藻粉中提取 LA,称取 0.100 0 g 研磨后的藻粉,加入 2 mL 体积比为 1:1 的无水乙醚和石油醚,震动混匀 2 h,提取液在 8 000 r/min 的条件下离心 5 min,上清液选用酸碱催化甲酯化的方法,即加入 3 mL KOH-甲醇溶液(0.5 mol/L),70 °C 水浴 15 min,取出并冷却,加入 4.5 mL 体积分数为 3% 的 H₂SO₄-甲醇溶液,充分振荡后 70 °C 水浴 20 min,使之甲酯化.冷却至室温,加入萃取剂 1 mL 乙醚.静置分层后,取上层乙醚定容到 1 mL,待 GC 测定.

1.3.2 藻粉提取剂及亚油酸甲酯萃取剂的比较

从溶剂的毒性、化学性质以及价格方面综合考虑,选取了 4 组备选提取溶剂:1) 体积比为 1:1 的乙醚/石油醚;2) 正己烷;3) 体积比为 3:2 的正己烷/异丙醇;4) 乙醇. 3 组备选萃取溶剂:1) 乙醚;2) 正己烷;3) 石油醚. 其余步骤同 1.3.1.

1.3.3 酯化方法的优化

选取 3 种酯化方法,分别为碱催化甲酯化法:步骤同 1.3.1;碱催化甲酯化法:加入 3 mL KOH-甲醇溶液(0.5 mol/L),70 °C 水浴 20 min;酸催化脂肪酸甲酯化法:加入 3 mL 体积分数为 2% 的 H₂SO₄-甲醇溶液,70 °C 水浴 20 min,分别测定每种酯化方法对 LA 含量的影响.

1.4 正交试验

结合以上实验结果,采用 L₉(3⁴) 正交试验对亚油酸甲酯化条件进行优化. 试验因素水平见表 1.

1.5 气相色谱分析条件

用气相色谱仪分析样品中的脂肪酸组成. 检测条件:采用 DM-35ms 型安捷伦毛细管柱,分流进样,分流进样体积比 30:1,进样量 0.000 2 mL;进样口温度 250 °C;程序升温条件:初始温度 150 °C,保留 1 min(升温速率 5 °C/min)至 220 °C,再升温至 280 °C(升温速率 20 °C/min),保留 15 min;采取氢火焰(FID)检测器,检测温度 280 °C. 各气流速:载气 N₂ 为 2 mL/min, H₂ 为 30 mL/min,空气为 300 mL/min.

表 1 正交试验因素水平表

Tab. 1 Factors and levels of orthogonai experiment

| 水平 | 因素 | | | |
|----|-----------------------|-----------------|------------------|---|
| | A 正己烷/异丙醇 (体积比) | B 提取时 间/h | C 提取 温度/°C | D w(H ₂ SO ₄)/ % |
| 1 | 3:1 | 1 | 4 | 1 |
| 2 | 3:2 | 3 | 20 | 2 |
| 3 | 3:3 | 5 | 40 | 3 |

1.6 标准曲线的绘制

样品的配制:购得 10 mg/mL 的亚油酸甲酯标准样品,用正己烷定容,配成 0.2, 0.4, 0.5, 0.8, 1.0 g/L 的溶液,每个溶液分别上机测定 3 次,取平均值. 以标准溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,如图 2. $y = 2\,317.308x - 64.960$, $R^2 = 0.9957$,说明在 0.2 ~ 1.0 μg 呈良好线性关系.

图 2 LA 含量标准曲线

Fig. 2 Calibration curve of LA

根据回归曲线方程得出小球藻中 LA 含量的计算公式:

$$\omega = \frac{A + 64.960}{2\,317.308} \times 10^3 \times (0.1)^{-1} \times 10^{-3} = \frac{A + 64.960}{231.7308},$$

式中, ω 为每克小球藻粉中所含 LA 的质量(mg/g), 实验中每次藻粉用量为 0.100 0 g. A 为样品经过气相色谱检测到的峰面积.

1.7 加标回收率的测定

样品加标回收:取两份相同质量的藻粉,其中一份加入定量的 LA 标样;两份同时按相同的步骤进行预处理,计算加标回收率.

加标回收率的计算公式:

$$\text{回收率 } P(\%) = \frac{\text{测定值 } C - \text{本底值 } A}{\text{加标量 } B} \times 100\%.$$

2 结果与分析

2.1 不同藻粉提取溶剂对 LA 测定含量的影响

通过对不同溶剂体系测得 LA 含量进行比较,

确定合适的提取剂. 以不同的溶剂体系为横坐标, 以 LA 含量为纵坐标, 得图 3. 从图 3 可见, 用正己烷/异丙醇体系提取时, 提取的 LA 含量最大, 为 1.87 mg/g; 其次为乙醚/石油醚体系 1.47 mg/g; 乙醇体系时其提取率最低, 只有 0.67 mg/g, 仅相当于正己烷/异丙醇体系提取量的 35.6%.

图 3 不同提取溶剂对 LA 测定的影响

Fig. 3 Effect of different solvents on determination of LA

溶剂加入藻粉时, 溶剂直接从破碎细胞溶出油脂; 对于未破碎的细胞, 溶剂必须通过细胞壁透入细胞, 溶解可溶性物质后, 细胞内外形成浓度差, 细胞内高浓度溶液不断向外扩散, 溶剂又不断进入细胞, 如此往返, 将藻粉中油脂提取出来. Grima 等^[4]曾经比较了 7 种常用提取体系对球状鞭金藻中粗脂肪的提取率, 结果表明: 采用正己烷/异丙醇体系的提取率较高; 赵薇等^[5]比较了 KOH-甲醇、乙醚-石油醚、氯仿-甲醇、乙醇、HCL-甲醇 5 种溶剂体系对紫球藻中花生四烯酸(AA)和 EPA 的影响, 显示乙醚-石油醚体系优于乙醇体系. 因此选择正己烷/异丙醇体系进行后续实验研究.

2.2 不同亚油酸甲酯萃取剂对 LA 测定含量的影响

通过不同亚油酸甲酯萃取剂对 LA 含量测定结果相互比较, 确定合适的萃取剂. 以不同的萃取剂体系为横坐标, 以 LA 含量为纵坐标, 得图 4. 从图 4 可以得到萃取效果由强到弱依次是乙醚 > 正己烷 > 石油醚.

亚油酸甲酯的萃取剂, 通过相似相容原理将甲酯化后的酯类溶解在萃取剂中, 从而达到分离的效果. 常见萃取剂的亲脂性的强弱顺序为(亲水性则相反): 甲醇 < 乙醇 < 丙酮 < 乙酸乙酯 < 乙醚 < 氯仿 < 苯 < 石油醚 < 正己烷. 由此可以看出, 酯类和乙醚的极性最为接近, 由相近相容原理可知, 用乙醚萃取效果最佳. 这和实验结果一致. 此时小球藻中

图 4 不同亚油酸甲酯萃取剂对 LA 测定的影响

Fig. 4 Different methyl linoleate extraction agent on influence of LA determination

LA 含量为 2.04 mg/g. 因此选择乙醚作为萃取剂进行后续实验研究.

2.3 酯化方法对提取 LA 的影响

不同的酯化方法对亚油酸酯化程度不同, 通过 GC 测定的亚油酸甲酯含量, 选择合适的甲酯化方法. 以不同的酯化方法为横坐标, 以 LA 含量为纵坐标得图 5.

图 5 酯化方法对 LA 测定的影响

Fig. 5 Effect of different solvents on determination of LA

由图 5 可以明显看出, 对于 LA 的甲酯化效果由强到弱依次是酸法 > 碱酸法 > 碱法. 3 种方法中酸催化脂肪酸甲酯化法最好, 此时小球藻中 LA 质量比为 2.91 mg/g. 寇秀颖等^[6]对酸法和碱法两类甲酯化方法进行研究, 发现酸催化既适用于酯化游离脂肪酸, 也适用于酯化脂肪; 碱法只适合酯化脂肪, 不适合酯化游离脂肪酸, 酸法优于碱法. 范亚苇等^[7]选用酸催化、碱催化和三甲基硅重氮甲烷(TMS)法对 CLA 进行甲酯化, 结果显示酸法甲酯化后共轭亚油酸 73.34%, 优于碱法, 与本实验结果一

致. 唐芳等^[8]采用酸法, 碱酸法, 碱法对山茶油脂肪酸甲酯化, 显示碱酸法优于碱法优于酸法, 与本文有所差别.

2.4 酸催化甲酯化法优化

在以上实验的基础上, 采用 $L_9(3^4)$ 正交试验对酸催化甲酯化条件进一步优化. 具体设计见表 2.

表 2 小球藻提取 LA 正交试验结果

Tab. 2 Orthogonal test of LA extraction from Chlorella

| 实验号 | A | B | C | D | $w(\text{LA})/(\text{mg}\cdot\text{g}^{-1})$ |
|----------|---------|--------|--------|--------------------------------|--|
| | 正己烷/异丙醇 | 提取时间/h | 提取温度/℃ | H_2SO_4 体积分数/% | |
| 1 | 3:1 | 1 | 4 | 1 | 1.988 |
| 2 | 3:1 | 3 | 20 | 2 | 1.929 |
| 3 | 3:1 | 5 | 40 | 3 | 1.561 |
| 4 | 3:2 | 1 | 20 | 3 | 2.563 |
| 5 | 3:2 | 3 | 40 | 1 | 1.704 |
| 6 | 3:2 | 5 | 4 | 2 | 1.901 |
| 7 | 3:3 | 1 | 40 | 2 | 3.002 |
| 8 | 3:3 | 3 | 4 | 3 | 2.111 |
| 9 | 3:3 | 5 | 20 | 1 | 1.791 |
| 水平 1 平均值 | 1.826 | 2.518 | 2.000 | 1.828 | |
| 水平 2 平均值 | 2.056 | 1.915 | 2.094 | 2.277 | |
| 水平 3 平均值 | 2.301 | 1.751 | 2.089 | 2.079 | |
| 极差 | 0.475 | 0.767 | 0.074 | 0.449 | |

实验结果表明, 随着正己烷/异丙醇的体积比由 3:1 升至 3:3, LA 提取的含量逐渐升高. 当正己烷/异丙醇的比例为 3:3 时提取效果最好, 在此条件下得出藻粉中 LA 的平均质量比为 2.30 mg/g. 随着提取时间的增加(1~5 h), LA 提取的含量逐渐减小, 水平 1 提取效果最好, 在此条件下得出藻粉中 LA 的平均质量比为 2.52 mg/g. 提取时间对小球藻中不饱和脂肪酸提取的影响较大, 主要是因为小球藻中不饱和脂肪酸容易在高温情况下被空气氧化, 在常温下也可被缓慢氧化, 因此在选取小球藻不饱和脂肪酸提取方法时, 提取时间不宜过长, 但是提取时间过短, 藻内不饱和脂肪酸未能充分提取. 随着提取温度的升高(4~40℃), LA 提取的含量先增加后不变. 当提取温度为 20℃ 时提取效果最好, 在此条件下得出藻粉中 LA 的平均质量比为 2.09 mg/g. 但此因素极差为 0.074, 此因素对提取条件影响不显著, 可忽略不计. 随着 H_2SO_4 体积分数的升高(1%~3%), LA 提取的含量先升高后下降. 在 H_2SO_4 体积分数为 2% 时得到峰值, 此条件下得出藻粉中 LA 的平均质量比为 2.28 mg/g. H_2SO_4 -甲醇溶液对实验也有较大影响, 提高 H_2SO_4 体积分数可使酯化更加完全, 但甲醇用量增加有利于油的溶解^[9], 有利于醇相的反应, 故体积分数为 2% 时比较

适合亚油酸酯化.

通过方差分析, 可以看出正己烷/异丙醇、提取时间、 H_2SO_4 体积分数三个因素对提取结果影响极显著, 提取温度对提取结果影响不大. 对 LA 的提取结果影响因素大小顺序为提取时间 > 正己烷/异丙醇 > H_2SO_4 浓度 > 提取温度.

综上所述: 实验表观优化条件为实验 7 (A3B1C3D2), 即当正己烷/异丙醇为 1:1, 提取时间为 1 h, H_2SO_4 -甲醇溶液中 H_2SO_4 的体积分数为 2% 时 LA 提取效果最好. 此时小球藻中每克藻粉 LA 质量为 3.00 mg. 实验计算较优条件为 (A3B1C2D2), 因为实验因素 C 提取温度的极差为 0.074, 对实验影响极小, 且水平 C2 与 C3 平均值相差不大, 因此不需要进行验证实验.

2.5 加标回收率测定结果

将藻粉中加入 0.5 mg LA 标样, 进行加标回收率的计算, 结果见表 3.

经过计算整个实验流程的加标回收率可知, LA 的加标回收率为 72%, 说明还有产物在实验提取过程中存在一定程度的损失. 为了更准确的反应小球藻各个脂肪酸的真实含量, 还需进一步根据回收率计算出实际值. 其实际值 = 测定值/加标回收率, 计算得出小球藻中每克藻粉 LA 质量的实际值为

4. 17 mg.

表3 加标回收率测定

Tab. 3 Admeasurement of addition standard recovery

| 名称 | 本底值 A/mg | 测定值 C/mg | 加标量 B/mg | 回收率 P/% |
|----|-------------|-------------|-------------|------------|
| LA | 0.37 | 0.73 | 0.50 | 72 |

3 结论

本实验通过对藻粉中 LA 的 GC 测定预处理条件的研究,确定优化的预处理方法为:藻粉中加入体积比为 3:2 的正己烷/异丙醇溶液 2 mL,提取 1 h,3 mL 体积分数为 2% 的 H_2SO_4 -甲醇溶液甲酯化,1 mL 乙醚对亚油酸甲酯进行萃取. 最终测定小球藻中每克藻粉含 LA 3.00 mg,通过加标回收率得出实际含 LA 4.17 mg.

从异养小球藻中提取测定 LA,可以有效地减少对玉米等粮食作物的消耗,在当今这个粮食紧缺的时代,具有非常重要的实用价值.

参考文献:

[1] 陈洁. 油脂化学[M]. 北京:化学工业出版社, 2004:

190-196.

- [2] 黄宝玺,王大为,王金凤. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 农业工程技术,2009(8):26-30.
- [3] Brawn K, Fridovich I. DNA strand scission by enzymically generated oxygen radicals[J]. Archive of Biochemistry and Biophysics,1981,206(2):414-419.
- [4] Grima E M, Medina A R, Gimenez A G, et al. Comparison between extraction of lipids and fatty acids from microalgal biomass[J]. J Am Oil Chem Se,1994,71(9):955-959.
- [5] 赵薇,吴义诚,江贤章,等. 提取及培养条件对紫球藻 AA 与 EPA 的影响[J]. 食品工业科技,2009,30(3):168-171.
- [6] 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.
- [7] 范亚苇,邓泽元,余永红,等. 不同脂肪酸甲酯化方法对共轭亚油酸分析的影响[J]. 中国油脂,2007,32(2):52-55.
- [8] 唐芳,李小元,吴卫国,等. 山茶油脂肪酸甲酯化条件研究[J]. 粮食与油脂,2010(8):36-39.
- [9] 张搏. 固体酸催化剂催化脂肪酸甲酯化反应[J]. 化学反应工程与工艺,2010,26(1):88-91.

Sample Pretreatment Methods for Linoleic Acid in Chlorella Powder by GC Analysis

LI Jin-sui, WANG Ping, LI Ao-bo

(School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing 100048, China)

Abstract: Linoleic acid as a kind of novel functional oil, has received more and more attention. Sample pretreatment methods for linoleic acid in chlorella powder by GC analysis were studied in this paper. The optimal pretreatment conditions were established by single factor experiments and an orthogonal experiment. The best pretreatment method was acid-catalyzed methylation. The optimum parameters were listed as follows: 2 mL of N-hexane and isopropyl alcohol 1(1:1), Reaction time 1 hour, 3 mL of 2% H_2SO_4 -methanol solution for methylation, 1 mL of ether for methyl linoleate extraction. Under these conditions, the content of linoleic acid was 3.00 mg/g.

Key words: heterotrophic chlorella; linoleic acid; gas chromatography; pretreatment

(责任编辑:叶红波)