

金藻中 EPA 的分离与分析

李 润¹ 张秀荣¹ 张万宽¹ 许振国²

(¹ 清华大学化学系 北京 100084)

(² 山东荣成鸿洋神集团 威海 264321)

提要 为建立金藻 *Isochrysis galbana* 中 EPA 的分离与分析方法,对金藻中的脂肪酸进行萃取分离和酯化,硅胶薄板检验酯化程度,利用气相色谱(GC)进行定性分析,用内标法对 EPA 进行定量分析。测得藻粉中 EPA 含量为 1.92%。

关键词 金藻, EPA, 分离, 气相色谱

EPA 的传统来源是鱼油,但鱼油数量有限,从鱼油中纯化 EPA 有一定难度,且具有难以去除的鱼腥味。因此,寻找 EPA 的新来源受到关注^[1-3]。近年来,人们发现某些海洋微藻中含有较多 EPA,作者用气相色谱仪(GC)对金藻 *Isochrysis galbana* 中脂肪酸进行分析,并对 EPA 的含量进行了测定。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

金藻由清华大学生物系培养。

氯仿、甲醇、无水乙醇、正庚烷、氢氧化钠、乙酸乙酯均为分析纯,北京化工厂出品。

石油醚(60~90℃),分析纯,中国人民解放军第九零六六工厂。

BF₃ 乙醚溶液,分析纯,北京八零九厂。

EPA 乙酯,99.6%,中国药品生物制品检定所。

C₁₉ 脂肪酸乙酯,99%,SIGMA 公司。

HP6890 plus 气相色谱仪。

收稿日期:2000-11-03;修回日期:2001-04-05

1.2 实验步骤

1.2.1 粗脂肪的分离

参考文献[4,5]方法,取干燥藻粉 0.3876 g,充分研磨后,置于 50 ml 三口瓶中,加入 38 ml 氯仿:甲醇:水的体积比为 1:2:0.8 的混合液,充氮,充分搅拌,在室温下;连续萃取 8 h.然后加入 15 ml 氯仿和 15 ml 氯仿:甲醇:水的体积比为 1:1:0.9 的混合液,静置分层,分出下层有机相,用氮气吹干,得粗脂肪 0.2073 g.

1.2.2 粗脂肪的乙酯化

取粗脂肪 50 mg 置入 50 ml 容量瓶中,加入 0.5 mol/L 的 NaOH 乙醇溶液 5 ml,盖紧塞子,80 °C 水浴加热 6 min,加入 10 ml 酯化试剂,80 °C 水浴加热 10 min,取出冷却,加入 35 ml 饱和 NaCl 溶液,2 ml 正庚烷,振摇混匀,静置分层,取上层正庚烷液进行分析.酯化试剂由市售 BF₃ 乙醚溶液与无水乙醇以体积比 1:3 相配.

1.2.3 检验乙酯化程度

取上述乙酯化样品 5 μl 点于硅胶薄板上(20 cm×5 cm,预先于 110 °C 活化),用体积比为 80:20 的石油醚:乙酸乙酯展开,然后用碘蒸气显色.

1.2.4 定性和定量分析

配制被测样品,用 GC 进行定性.GC 分析条件为:HP6890 柱,长 30 m,内径 0.25 mm;载气为 N₂,流速 1.5 ml/min;程序升温 150~220 °C,25 °C/min,于 220 °C 保持 1 min,220~250 °C,3 °C/min,于 250 °C 保持 6 min,气化室温度和检测室温度均为 300 °C.内标法测定 EPA 乙酯的含量.用 C₁₉ 脂肪酸乙酯作为内标.配制一系列 EPA 乙酯标准溶液,进行气相色谱分析.取样品粗脂肪酸,加入 C₁₉ 脂肪酸乙酯,按上述条件进行处理分析.

2 结果与讨论

2.1 乙酯化程度

脂肪酸、醇类和脂肪酸乙酯的 R_f 值依次增大.脂肪酸点消失,说明乙酯化反应完全.

2.2 定性分析

图 1 为粗脂肪乙酯化后进样得到的气相色谱图,保留值 10.158 处有一峰;图 2 为 C₁₉ 脂肪酸乙酯和 EPA 乙酯标样混合后进样得到的气相色谱图,保留值 10.179 处峰为 EPA 乙酯;图 3 为前面两个样品混合后进样所得气相色谱图,保留值 10.183 附近只出现一个峰;综合图 1,2,3 可基本判定图 1 中保留值 10.158 处峰为 EPA 乙酯.

2.3 定量分析

其中, M_s 为内标物质量, M_i 为 EPA 乙酯质量, A_s 为内标物峰面积, A_i 为 EPA 峰面积.进行规一,可求得校正因子 F_i 为 2.072.

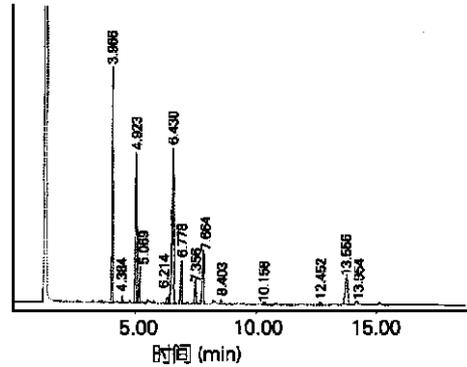


图 1 粗脂肪酸乙酯化样品气相色谱

Fig.1 GC spectrum of ethyl esterified crude fatty acid

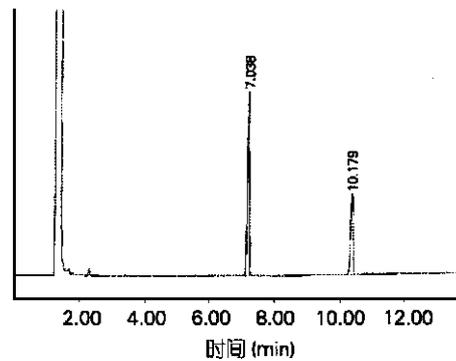


图 2 EPA 乙酯标准样品的气相色谱

Fig.2 GC spectrum of standard product of ethyl esterified EPA

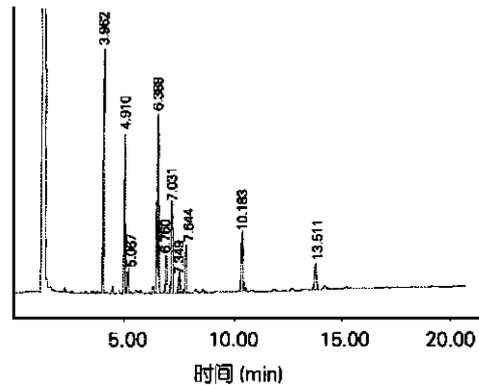


图 3 粗脂肪酸乙酯与 EPA 标样混合后的气相色谱

Fig.3 GC spectrum of mixture of ethyl esterified crude fatty acid and standard product of ethyl esterified EPA

$$y = 2.072x - 0.358 \quad R^2 = 0.9987$$

其中, $y = A_s / A_i$, $X = M_s / M_i$

取粗脂肪 14.4 mg, 加入 0.35 mg C₁₉ 脂肪酸乙酯作为内标物, 按上述条件进行处理和分析, 所测得

表 1 标准溶液气相色谱图中的峰面积

Tab.1 Peak area of standardized solution's GC spectrum

M_s (mg)	M_i (mg)	M_s / M_i	A_s	A_i	A_s / A_i
0.335	0.0625	5.36	47 928 993	4 392 172	10.912 367
0.335	0.125	2.68	34 563 447	7 066 347	4.891 275 0
0.335	0.25	1.34	19 649 847	8 650 119	2.271 627 4
0.335	0.5	0.67	10 761 995	9 724 247	1.106 717 6
0.335	1	0.335	5 395 216	9 942 487	0.542 642 5

表 2 样品中 EPA 的峰面积 A_i

Tab.2 Peak area A_i of EPA thyl in sample

样品	A_i				相对标准偏差 ($\times 10^{-4}$)
	1	2	3	平均值	
粗脂肪酸乙酯 + 内标	5 818 023	5 818 624	5 818 428	5 818 358	0.527

表 3 样品中 C_{19} 酸乙酯的峰面积 A_s

Tab.3 Peak area A_s of Nonadecanoic(C_{19}) acid ethyl in sample

样品	A_s				相对标准偏差 ($\times 10^{-4}$)
	1	2	3	平均值	
粗脂肪酸乙酯 + 内标	7 462 202	7 462 976	7 461 548	7 462 242	0.958

表 4 样品中 EPA 乙酯的质量 M_i

Tab.4 M_i mass of EPA ethyl in sample

样品	M_i				相对标准偏差 ($\times 10^{-4}$)
	1	2	3	平均值	
粗脂肪酸乙酯 + 内标	0.565 4	0.565 4	0.565 5	0.565 4	1.021

EPA 乙酯的峰面积 A_i 和内标物峰面积 A_s 分别列于表 2、表 3。

取校正因子 $F_{i,s}$ 为 2.072, 根据公式

$$M_i = F_{i,s} \times A_i \times M_s / A_s$$

计算 14.4 mg 粗脂肪中所含 EPA 乙酯的质量 M_i 。

藻粉中 EPA 含量为: 0.565 4 / 14.4 ×

207.3 / 387.6 × 302.5 / 330.5 × 100% = 1.92%, 其中 302.5 是 EPA 分子量, 330.5 是 EPA 乙酯分子量。

参考文献

- 姜悦, 陈峰, 梁世中. 海洋科学, 1997, 2: 18 ~ 20
- 纪明候等. 海藻化学. 北京: 北京科技出版社, 1997. 511
- 良铸. 生化制药学. 北京: 中国医药科技出版社, 1991. 310
- J. C. Ogbonna, S. Toomiya, H. Tanaka. *J. of Applied Phycology*, 1998, 10: 67 ~ 74
- M. Kitana, R. Matsukawa, I. Karube. *J. of Applied Phycology*, 1998, 10: 101 ~ 105

SEPARATING AND ANALYZING EPA FROM *Isocrysis galbana*

LI Run¹ WANG Hong¹ XU Zheirguo² SUN Jing² MA Weirong²
 (Chemistry Department, Tsinghua University, Beijing 100084)
 (Rongcheng Hingyangshen Group, Weihai 264321)

Received: Nov. 13, 2000

Key Words: *Isocrysis galbana*, EPA, Separation, GC

Abstract

Marine microalgae *Isocrysis galbana* containing polyunsaturated fatty acids (PUFA) is potential commercial sources of 5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid (EPA). To establish the method of isolating and analyzing EPA from *I. galbana*, we employ GC to determine EPA after extracting, separating and ethyl esterifying fatty acid. A rapid method for analyzing the content of EPA in microalgae *I. galbana* is established. (本文编辑: 张培新)