

藻类脂肪酸的测定 气相色谱法试验

(根据中华人民共和国海洋行业标准 HY/T 228-2018)

一、原理

脂肪酸是指一端含有一个羧基的长的脂肪族碳氢链，是有机物，直链饱和脂肪酸的通式是 $C(n)H(2n+1)COOH$ ，低级的脂肪酸是无色液体，有刺激性气味，高级的脂肪酸是蜡状固体，无可明显嗅到的气味。脂肪酸是最简单的一种脂，它是许多更复杂的脂的组成成分。脂肪酸在有充足氧供给的情况下，可氧化分解为 CO_2 和 H_2O ，释放大量能量，因此脂肪酸是机体主要能量来源之一。

藻类样品中的脂肪酸，经氢氧化钠甲醇溶液皂化和盐酸甲醇溶液甲酯化，经正己烷提取后，用气相色谱法测定。

二、使用试剂

1. 氢氧化钾
2. 盐酸
3. 氯化钠
4. 正己烷
5. 甲醇
6. 无水硫酸钠：400℃灼烧 4h，冷却后密闭保存，有效期 1 个月

三、试剂配制

1. 饱和氢氧化钾甲醇溶液：称取 40g 氢氧化钾溶解在 100ml 甲醇中，搅拌溶解，澄清备用，室温下可放置 2 个月。
2. 盐酸甲醇溶液：量取 10ml 盐酸溶解在 110ml 甲醇中，混匀，室温下可放置 2 个月。
3. 饱和氯化钠溶液：称取 360g 氯化钠溶液在 1L 蒸馏水中，搅拌溶解，澄清备用，室温下可放置 2 个月。

四、使用仪器

1. 气相色谱仪：具有氢火焰离子化检测器
2. 电热恒温水浴锅
3. 电子天平
4. 粉碎机
5. 具塞离心管
6. 容量瓶

五、分析步骤

1. **藻粉的制备** 藻类经冷冻干燥 24h，干燥后大型藻经过粉碎机粉碎过 80 目筛
2. **皂化** 用天平称取藻粉约 20mg，放入研钵中，准确加入 0.2ml 十一碳酸甘油三酯内标溶

液，加入液氮反复研磨 2~3 次，每次 5min，用 6ml 饱和氢氧化钾甲醇溶液分 2~3 次将研磨后的藻粉转移至具塞离心管中，混匀。将离心管放入 60°C 水浴槽内加热处理 60min，每隔 10min 取出振荡 5~10s，处理结束后取出离心管冷却至室温。

3. 甲基化 皂化后的试样加入 4ml 1mol/L 盐酸甲醇溶液混匀，将离心管放入 60°C 水浴锅内加热处理 20min，每隔 10min 取出振荡 5~10s，处理结束后取出离心管冷却至室温。

4. 萃取 甲基化后的试样准确加入 1ml 正己烷，加入 3ml 饱和氯化钠溶液，将管盖拧紧，用涡旋振荡器 2min，静置 3~5min 待溶液分层后，取大约 0.5ml 上层正己烷，用无水硫酸钠脱水后进行气相色谱分析。

六、仪器测试条件

取单个脂肪酸甲酯标准溶液和脂肪酸甲酯混合标准溶液分别注入气相色谱仪，对色谱峰进行定性。色谱分析条件如下：

1. 色谱柱：毛细管色谱柱涂层为键合/交联聚乙醇，涂层厚度 0.25um，内径 0.25mm，长度为 30m。
2. 载气：高纯度氢气 1.5mL/min
3. 氢气：高纯 30mL/min
4. 空气：高纯 300mL/min
5. 尾吹：高纯氮气 35mL/min
6. 检测器温度：300°C
7. 进样口温度：250°C
8. 进样量：1um
9. 进样方式：无分流进样
10. 升温程序：初温 50°C，保持 5min，25°C/min 升到 180°C，1°C/min 升到 190°C，保持 10min，1°C/min 升到 205°C，保持 10min，20°C/min 升到 240°C，保持 5min。

七、结果计算

1. 单个脂肪酸甲酯含量

根据被测物和内标物的质量及在色谱图上相应的峰面积比，由校正因子按式(1)计算单个脂肪酸甲酯的含量：

$$X_i = \frac{W_s \times F_{si} \times A_i \times 1.0067}{A_s \times W} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- X_i ——藻类中脂肪酸甲酯 i 组分的含量，单位为毫克/克(mg/g)；
 - W ——藻类的质量，单位为毫克(mg)；
 - W_s ——样品中加入内标物的质量，单位为微克(μ g)；
 - A_s ——内标物的峰面积；
 - A_i ——藻类中脂肪酸甲酯 i 组分的峰面积；
 - F_{si} ——相对校正因子。
- 1.0067 ——十一碳酸甘油三酯转化成十一碳酸甲酯的转换系数。

2.归一化法

藻类样品中某个脂肪酸甲酯组分的百分比按式(3)计算,通过测定相应峰面积对所有成分峰面积总和的百分数来计算给定组分*i*的含量。

用归一化法计算出脂肪酸甲酯组分的百分含量,以占脂肪酸甲酯总量的百分比表示,按式(3)计算:

$$Y_i = \frac{A_i}{\sum A_i} \dots\dots\dots(3)$$

式中:

Y_i ——藻类中脂肪酸甲酯*i*组分的百分含量;

A_i ——藻类中脂肪酸甲酯*i*组分的峰面积。

八、注意事项

1. 十一碳酸甘油三酯内标溶液, 冰箱 4℃避光冷藏保存, 有效期 1 个月
2. 单个脂肪酸甲酯标准溶液, 贮存于-20℃冰箱, 有效期 1 个月
3. 混合脂肪酸甲酯标准溶液, 贮存于-20℃冰箱, 有效期 3 个月