

等鞭金藻與擬球藻脂肪酸組成分析及測定方法之探討

蘇惠美、陳苑菁、王淑欣、陳紫嫻

水產試驗所東港生技研究中心

前言

在食物鏈底層的微藻具有 CO_2 利用效率佳、生產力比陸生植物高、可利用貧瘠土地培養等優點，過去曾因可作為生質燃油原料而成為全球注目的焦點。近年，微藻應用重心轉至作為食物、飼料、材料及化學品之料源。海洋微藻含有高量油脂、蛋白質與碳水化合物，可應用於不同的市場，特別是含有豐富二十碳五烯酸 (Eicosapentaenoic acid, EPA) 與二十二碳六烯酸 (Docosahexaenoic acid, DHA) 等長鏈多元不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acid, LCPUFA) 的微藻 (如等鞭金藻與擬球藻)，可開發直接作為食物或取代魚油做為動物飼料，是歐盟 25 研究夥伴未來 5 年的研發重點。

微藻油含量測定是評估藻種、養殖策略與設施的必要指標。油脂含量測定須經以下過程：藻水細胞經濃縮、去水、去鹽、乾燥後成為測定用樣本，再經珠磨或超音波震盪等處理，使藻細胞破碎以利萃取；然後進行萃取/甲基化二段式或直接轉酯化步驟，取得脂肪酸甲酯 (fatty acid methyl esters) 溶液；利用氣相層析儀產生圖譜，經由與標準品圖譜面積與層析時間比對，計算各種脂肪酸甲酯之含量，然後加總得到總脂肪酸甲酯含

量，一般就以該總含量換算為微藻之油含量。

許多文獻顯示，藻種、培養條件、營養鹽配方以及油脂萃取方式，均會影響微藻之油含量。筆者等開始進行微藻油含量分析時，發現同一樣品在同一實驗室同一時間重複誤差為 4—5%，不同時間誤差達 13—17%；在不同實驗室以不同方法測得之油含量則相差 16—27%，顯示精確測得微藻之油含量的方法仍待試驗來落實。後來研讀 Christie (1994, 2007 再版)「為什麼我不喜歡三氟化硼 (BF_3)—甲醇 (MeOH)」乙文，發現三氟化硼/甲醇雖是廣泛使用的甲基化試劑，但有很多缺點。文中推薦資淺科學家應確實閱讀 Morrison and Smith (1964) 原報告，而不要用科學家 A 提供訊息給科學家 B，科學家 C 採用科學家 B 的一般用法，以致忽略原科學家 A 數十年前的報告原貌。脂肪分析的初學者應嚴格評估使用方法和考慮替代物，專業分析者應該了解使用這個試劑會導致結果不一致的原因。特別重要的是操作微量樣本時，通常不易發現甲酯化產生的問題，務必使假波峰產生的機會減到最小。

於是從文獻中了解脂肪酸甲酯之測定，包括脂肪酸甲酯的製備及氣相層析法 (國家標準檢驗法 CNS 14759)。脂肪酸甲酯的製備從二階段法使用甲醇/乙醯氯 ($\text{MeOH}/\text{Acetyl}$

Chloride) (Folch et al., 1957) 以及三氟化硼/甲醇 (Morrison and Smith, 1964) 作甲基化試劑，到直接轉酯化法使用乙醯氯 (Lepage and Roy, 1984; Rodriguez-Ruiz et al., 1998) 或三氟化硼 (Hsieh and Wu, 2009; Su et al., 2010; Bigelow et al., 2011; 葉, 2012) 為試劑；以及最近在魚苗橈足類等微量樣品，測定含長鏈多元不飽和脂肪酸 (LCPUFA) 組成，使用甲苯/甲醇/乙醯氯 (Toluene/MeOH/Acetyl Chloride) 作試劑 (Drillet et al., 2006)。

經過上百個樣品之試驗比較，本文報告以 Drillet et al. (2006) 二階段及葉 (2012) 直接轉酯化的修改方法，分析等鞭金藻 (*Tisochrysis lutea* 原稱 *Isochrysis* aff. *galbana*) 與擬球藻 (*Nannochloropsis oceanica* 原稱 *N. oculata*) 之脂肪酸組成及脂肪酸甲酯含量之結果，並比較二種方法之優缺點，作為後續探討養殖條件、藻株等，對微藻脂肪酸組成定量與定性分析之參考。

實驗用藻類、試藥與設備

等鞭金藻在室內 30 L 連續照光培養，擬球藻在戶外 1,000 L 渠道槽養殖，在增殖對數後期收穫，經連續式離心機濃縮去水、去鹽，以冷凍乾燥機製成藻粉後儲存於-20℃。實驗試藥包括氫氧化鉀、氯化鈉、碳酸氫鈉、氯仿 (CHCl₃)、甲醇、正己烷 (n-Hexane 85%)、正庚烷 (Heptane)、鹽酸、三氟化硼/甲醇 (14% BF₃/Methanol)、甲苯、乙醯氯、17 酸甲酯 (Methyl-heptadecanoate)、37 種脂肪酸混合標準品 Supelco 37 component FAME mix、多元不飽和脂肪酸混合標準品 PUFA

No. 3 Mix (Menhaden Oil Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) Methyl Esters)、高純氬氣、氮氣及合成空氣。設備有恆溫循環水槽 BH-230D、乾浴機 Pantech 6100、超音波震盪清洗器 Power sonic 520、氣相層析儀 Shimadzu GC-2014、中量球磨機 Retsch MM400 及抽氣櫃。

脂肪酸甲酯測定

一、脂肪酸甲酯的製備

(一) 萃取與轉脂化兩階段法參考 Drillet et al. (2006) 修改如下：

1. 精秤約 50 mg 藻粉加入 3 ml 氯仿：甲醇 (2:1 v/v) 及 1 ml 標準品 C17-甲酯 (濃度 1,000 µg/ml) 至 12 ml 玻璃小瓶中。
2. 使用超音波震盪 60 分鐘進行破壁。
3. 鎖上瓶蓋放置在-20℃冰箱中 24 小時。
4. 儘可能將耐熱玻璃小瓶中的液體轉移到 1.5 ml GC 小瓶中。
5. 將 GC 小瓶放到鋁製加熱器 (60℃)，進氮氣將瓶中氯仿甲醇溶劑揮發至乾 (約 20 分鐘)。
6. 加入 1 ml 乙醯氯/甲醇/鹽酸試劑。乙醯氯/甲醇/鹽酸試劑由 85 ml 甲醇、66 ml 甲苯和 15 ml 乙醯氯混合，製備時使用磁力攪拌器，混合順序非常重要，最後將乙醯氯緩慢加入。使用前製備，儲存在室溫下最多 1 個月。
7. 蓋上瓶蓋，在鋁製加熱器 95℃ 下加熱 2 小時。
8. 取出 GC 小瓶放冷。
9. 打開瓶蓋，使用 1,000 µl 微量滴管加入

500 μ l 5% 碳酸氫鈉溶液。關緊瓶蓋並震盪，打開瓶蓋抽取上層相液體，移至乾淨 GC 小瓶。

10. 使用 1,000 μ l 微量滴管加入 500 μ l 正庚烷，關緊瓶蓋並震盪，取出上層液體，移入含前次萃取液之 GC 小瓶。重複本動作一次。
11. 將含有上層液體的 GC 小瓶，放至鋁製加熱器 (60°C)，使用氮氣吹乾。
12. 取出 GC 小瓶加入 0.5 ml 氯仿冷凍保存。

(二) 直接轉酯化法珠磨參考葉 (2012) 修改如下：

1. 精秤約 10 mg 藻粉與 0.5 g 玻璃珠至 1.5 ml 離心管中，每個樣本 4 管。
2. 每管加入 1 ml 0.5 N 氫氧化鉀/甲醇。
3. 4 管同時進行珠磨 (頻率 30/s, 25 分鐘)。
4. 每個樣本 4 管倒入一個 50 ml 血清瓶中。
5. 每管再加入 1 ml 0.5 N 氫氧化鉀/甲醇混勻後，倒入同一血清瓶中。
6. 鎖緊瓶蓋 (注意有無漏氣)，100°C 水浴 15 分鐘。
7. 冷卻後，加入 8 ml 0.7 N 鹽酸/甲醇與 10 ml 三氟化硼/甲醇。
8. 鎖緊瓶蓋 (注意有無漏氣)，100°C 水浴 15 分鐘。
9. 冷卻後，加入 1 ml 標準品 C17:0 (0.5 mg/ml)。
10. 加入 2 ml 飽和食鹽水避免乳化，震盪 1 分鐘。
11. 加入 4 ml 正己烷，震盪 5 分鐘。
12. 以 5,000 rpm 離心 10 分鐘，取上層液至新的 4 ml 樣品瓶中，冷凍保存。

(三) 直接轉酯化法超音波震盪

1. 精秤約 100 mg 藻粉至 15 ml 離心管中。
2. 加入 6 ml 0.5 N 氫氧化鉀/甲醇。
3. 超音波震盪 60 分鐘進行破壁。
4. 倒入一個 50 ml 血清瓶中。
5. 離心管再加入 1 ml 0.5 N 氫氧化鉀/甲醇混勻後，倒入同一血清瓶中。
6. 重複 (二) 珠磨之 6–12 步驟。

二、氣相層析儀分析脂肪酸甲酯之條件及其定性與定量

氣相層析儀為 Shimadzu GC-2014 搭配火焰離子化偵測器，分析管柱為串聯 2 根毛細分離管 BPX70, 25 m $\times$ 0.22 mm $\times$ 0.25 μ m 與 BPX 70, 30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μ m，載體為氮氣。經過改變分離管長度、熱爐溫度、載氣壓力、分離管流量、氫氣流量與升溫條件等，可以將 2 種標準品：37 種脂肪酸混合及鯊魚油—含多元不飽和 18 種脂肪酸，層析分離如圖 1。設定烘箱初溫 50°C，以 8°C/min 升溫速率加熱至 160°C，再以 2.5°C/min 加熱至 230°C，並維持 10 分鐘。設定注射樣品量 1 μ l，自動注射樣品。將上述 2 種脂肪酸標準品中相同的成分加以整合，有 44 種脂肪酸甲酯之停滯時間。以 17 酸甲酯 C17:0 作標準品，在相同分析條件之下，依據各種脂肪酸甲酯在層析圖譜上出現之滯留時間，比較圖 1 之相對位置進行定性。定量則藉由樣品層析圖譜上不同碳數與已知濃度標準品之波峰面積比，換算出樣品中含有的各種脂肪酸甲酯的濃度與其佔總脂肪酸組成的百分比。

結果與討論

一、玻璃試管與血清瓶

使用內襯為鐵氟龍蓋子之玻璃試管與血清瓶作為反應容器，發現以玻璃試管測得之擬球藻油含量僅為血清瓶者之 50–60%。Morrison and Smith (1964) 討論使用三氟化硼/甲醇是否產生副作用時，以 3 種甲基化試劑 (14% BF₃-甲醇、3 N 鹽酸/甲醇或 5% 硫酸/甲醇) 加熱 90 分鐘後，發現不飽和脂肪酸甲酯會流失，損失較多的是多元不飽和脂肪酸甲酯；反應時間延長及濃度提高均增加流失量，因此強調必須注意反應試管之密封性，加熱時若反應瓶漏氣，將會使甲醇揮發因而增加三氟化硼濃度，如此加重不飽和甲基酯受破壞的問題。

二、以珠磨機和超音波震盪進行破壁

在直接轉酯化法中，比較珠磨與超音波處理破壁的影響，結果等鞭金藻之油含量 (實為脂肪酸甲酯總量) 沒有差異，分別為 $14.25 \pm 0.14\%$ DW 及 $14.49 \pm 0.11\%$ DW，但擬球藻細胞較不易破壁，採用珠磨機之油含量 $12.02 \pm 0.62\%$ DW，顯著高於超音波震盪之 $10.56 \pm 0.02\%$ DW。

在兩階段法比較以超音波震盪 1 小時與 2 小時，等鞭金藻與擬球藻之油含量與脂肪酸組成之差異。結果震盪 1 小時與 2 小時，等鞭金藻與擬球藻之油含量分別為 $15.72-15.80\%$ DW 與 $13.37-13.53\%$ DW，沒有顯著差異，飽和脂肪酸、omega 3 與 omega 6 多元不飽和脂肪酸也沒有顯著差異。

三、等鞭金藻與擬球藻之脂肪酸組成

以修正之直接轉酯化法 (等鞭金藻以超音波 1 小時，擬球藻以珠磨處理) 與兩階段法 (二種藻均以超音波 1 小時處理)，分析二種微藻凍乾藻粉。兩階段法的氣相層析圖譜

如圖 2，與直接轉酯化法圖譜相同，其脂肪酸組成如表所示。等鞭金藻總脂肪酸含量分別為 $14.49 \pm 0.10\%$ DW 與 $15.73 \pm 0.17\%$ DW，飽和脂肪酸 $5.02 \pm 0.03\%$ DW 與 $5.46 \pm 0.01\%$ DW、多元不飽和脂肪酸 $6.20 \pm 0.06\%$ DW 與 $6.93 \pm 0.11\%$ DW，有明顯差異，兩階段法均較高。擬球藻總脂肪酸含量分別為 $12.02 \pm 0.62\%$ DW 與 $13.37 \pm 0.37\%$ DW，飽和脂肪酸 $4.21 \pm 0.02\%$ DW 與 $4.38 \pm 0.13\%$ DW、多元不飽和脂肪酸 $4.56 \pm 0.07\%$ DW 與 $5.52 \pm 0.13\%$ DW，兩階段法的總脂肪酸與多元不飽和脂肪酸含量顯著較高。林 (2011) 研究有相同的結果，等鞭金藻萃取油脂後轉酯化，其飽和脂肪酸與不飽和脂肪酸的亞麻油酸 (C18:2) 與次亞麻油酸 (C18:3) 含量，都高於直接轉酯化者。

四、以直接轉酯化法與兩階段法製備脂肪酸甲酯的優缺點

二種製備脂肪酸甲酯的方法較大的差異是甲基化試劑及反應溫度與時間，二種試劑均有許多文獻採用，較大的爭議就如 Christie (1994, 2007) 再次提到為什麼不使用三氟化硼-甲醇，因為會使混合物的多元不飽和成分損失，與抗氧化劑起反應產生假波峰，建議使用乙醯氯/甲醇作為替代物。溫度控制上，二段法用加熱器控制 95°C 加熱 2 小時，直接法則分 2 段 100°C 各加熱 15 分鐘，中間需經冷卻，整個操作時間差不多。二段法將樣品置於 -20°C 下，24 小時有益萃取，也可再補加內標準。二段法不只測得較高油量，還可以得到粗脂肪量，上 GC 的甲酯濃度較高，相同重量的樣品使用的溶劑較少 (50 mg 藻粉 6 ml vs 32 ml)，且不需珠磨、不需離心。

以直接轉酯化與兩階段法測定等鞭金藻與擬球藻之脂肪酸組成與其含量 (% DW) (nd = 未測出)

脂肪酸甲酯	等 鞭 金 藻		擬 球 藻	
	直接轉酯化	兩階段萃取	直接轉酯化	兩階段萃取
C14:0	2.75 ± 0.02 ^b	3.19 ± 0.02 ^a	0.70 ± 0.04 ^b	0.84 ± 0.06 ^a
C16:0	2.04 ± 0.02	2.07 ± 0.00	3.43 ± 0.16	3.48 ± 0.06
C16:1	0.52 ± 0.01 ^b	0.60 ± 0.01 ^a	2.74 ± 0.12 ^b	3.02 ± 0.04 ^a
C18:0	0.08 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.01
C18:1n9c	2.74 ± 0.01	2.74 ± 0.04	0.51 ± 0.02	0.44 ± 0.07
C18:2n6c	2.63 ± 0.03 ^b	2.81 ± 0.05 ^a	0.39 ± 0.02	0.42 ± 0.00
C18:3n6	0.25 ± 0.00 ^b	0.28 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.00
C18:3n3	0.80 ± 0.00 ^b	0.93 ± 0.01 ^a	nd	nd
C20:0	0.06 ± 0.00	0.07 ± 0.02	nd	nd
C18:4n3	1.09 ± 0.01 ^b	1.41 ± 0.03 ^a	nd	nd
C20:3n6	nd	nd	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01
C20:4n6	0.07 ± 0.00	0.07 ± 0.01	0.75 ± 0.01	0.85 ± 0.07
C22:0	0.09 ± 0.00	0.07 ± 0.02	nd	nd
C20:5n3	0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.00	3.33 ± 0.21 ^b	4.16 ± 0.08 ^a
C22:6n3	1.29 ± 0.01 ^b	1.36 ± 0.02 ^a	nd	nd
Total FAMES	14.49 ± 0.11 ^b	15.73 ± 0.17 ^a	12.02 ± 0.62 ^b	13.37 ± 0.37 ^a
Total saturated	5.02 ± 0.03 ^b	5.46 ± 0.01 ^a	4.21 ± 0.02	4.38 ± 0.13
Total monoenes	3.26 ± 0.02	3.34 ± 0.05	3.24 ± 0.04	3.47 ± 0.11
Total n-6	2.95 ± 0.03 ^b	3.16 ± 0.05 ^a	1.24 ± 0.00	1.36 ± 0.06
Total n-3	3.25 ± 0.03 ^b	3.77 ± 0.06 ^a	3.33 ± 0.07 ^b	4.16 ± 0.08 ^a
Total PUFA	6.20 ± 0.06 ^b	6.93 ± 0.11 ^a	4.56 ± 0.07 ^b	5.52 ± 0.13 ^a

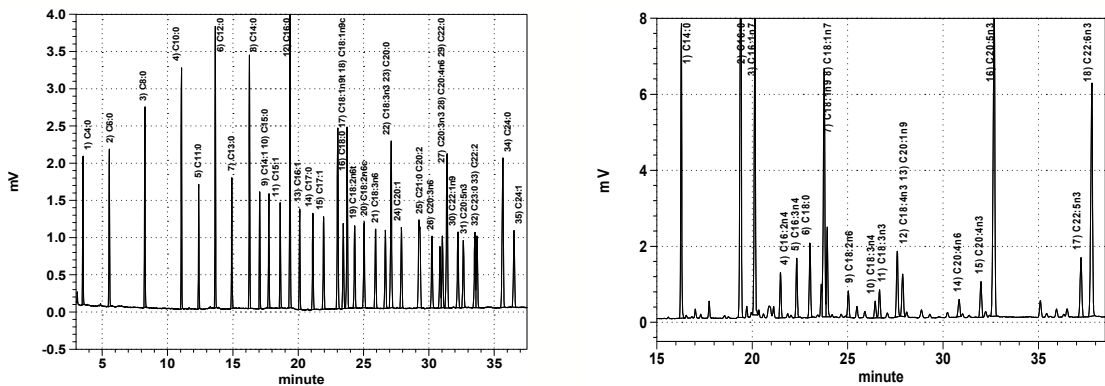


圖 1 二種標準品層析圖譜左為 37 種脂肪酸混合，右為鮭魚油-含多元不飽和 18 種脂肪酸

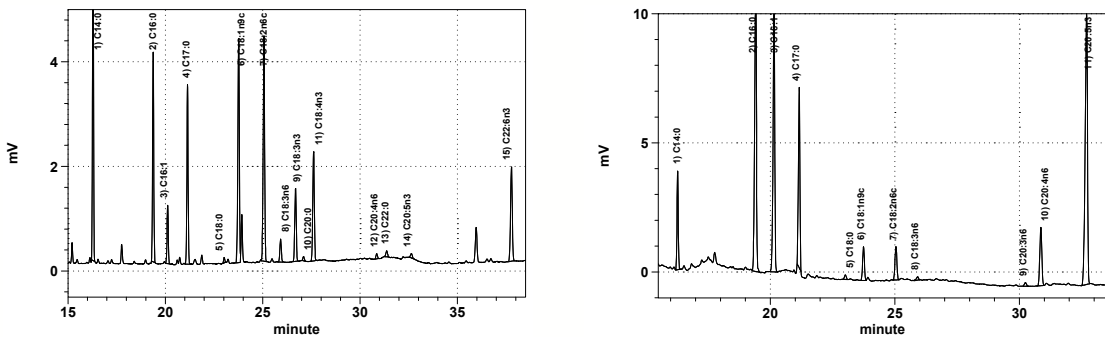


圖 2 以二階段法製備之等鞭金藻 (左) 與擬球藻 (右) 脂肪酸甲酯層析圖譜