

葡萄藻中烷烃化合物的 GC-MS 分析条件比较

魏东, 熊爽

(华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 通过单因素分析, 对不同溶剂、温度和时间条件下提取葡萄藻微量藻粉中碳氢化合物的效果进行了比较, 获得了最佳提取条件为: 40 mg 藻粉悬浮于正己烷中, 超声处理 (35 °C, 70 Hz) 半小时后再于 35 °C 下提取 10 h, 碳氢化合物得率最高, 占藻粉干重的 2.95%。比较获得了 GC-MS 分析的程序升温优化条件, 发现处于对数期的葡萄藻微量冻干藻粉中含量最高的碳氢化合物都是 C22-C31 长链烷烃, 其组成与含量分别为: 二十二烷 (50.40 μg/g)、二十四烷 (209.17 μg/g)、二十五烷 (351.45 μg/g)、9-辛基十七烷 (472.38 μg/g)、二十七烷 (540.48 μg/g)、二十八烷 (542.24 μg/g)、角鲨烯 (473.60 μg/g)、正三十一烷 (306.86 μg/g)。该提取和分析过程具有样品量少、时间短、得率高和操作简单的优点, 可作为葡萄藻碳氢化合物分析检测的一种快速高效途径。

关键词: 葡萄藻; 碳氢化合物; 提取

文章编号: 1673-9078(2014)5-280-286

Comparative Study of Extraction Conditions and GC-MS Analysis of Hydrocarbons from *Botryococcus sudeticus*

WEI Dong, XIONG Shuang

(School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: Based on ANOVA analysis of the solvents, temperatures and time, the optimal conditions for hydrocarbons extraction from small amount of algal powder of *Botryococcus sudeticus* were obtained as follows: 40 mg algal powder suspended in n-hexane was ultrasonicated at 35 °C and 70 Hz for 30 min, then extracted at 35 °C for 10 hours. The highest yield of hydrocarbons accounted for 2.95 % of dry weight was obtained under above conditions. The programmed procedure for GC-MS analysis was compared and optimized, and long-chain alkanes from C22 to C31 were found as the dominant hydrocarbons in the lyophilized powder of *Botryococcus sudeticus* from the cells in exponential phase. They were consisted of docosane, tetracosane, pentacosane, 9-octylheptadecane, heptacosane, octacosane, squalene and hentriacontane, with contents of 50.40, 209.17, 351.45, 472.38, 540.48, 542.24, 473.60 and 306.86 μg/g of dry weight, respectively. This extraction and analysis process have advantages of fewer amounts of sample required, time-saving, high yield and simple operation, which is a rapid and high efficient method for the analysis and detection of hydrocarbons from *Botryococcus sudeticus*.

Key words: *Botryococcus sudeticus*; hydrocarbons; extraction

当今世界正面临着能源短缺和环境污染两大危机, 开发绿色、清洁的可再生生物燃料代替传统化石燃料已成为国际研究热点, 而微藻来源的生物气、生物油、生物柴油等是最有希望的、可能代替化石能源的生物燃料^[1], 最终实现环境安全与能源安全的和谐^[2]。

葡萄藻 (*Botryococcus*) 又名丛粒藻、黄被藻, 是一种分布广泛的淡水单细胞绿藻, 常常集群生活在水中, 其老化细胞的产烃量为生物量干重的 0.3~

76.0%, 通常为25~40%, 在天然样品中最高达86%, 大大高于其他微生物的含烃量 (几乎都低于1%), 并且葡萄藻所产烃的组成和结构与石油极其相似, 在一些石油沉积物中几乎全部有机质都是该藻形成的, 是真正的“油藻”^[3], 作为最可望成为工业藻种的能源微藻已经引起全世界关注。人工培养葡萄藻还可进行CO₂生物固定、降低污水中的氮磷浓度, 起到温室气体减排、净化水体的作用, 有利于实现能源与环境的可持续发展。

葡萄藻通常在细胞生长的稳定期碳氢化合物的积累才达到最高峰, 甚至分泌到培养基中形成油滴, 因而碳氢化合物的含量测定多集中在稳定期细胞。而对数期的藻细胞个体形态、化学组成和生理特性等均较为一致, 细胞生长旺盛、抗胁迫能力强, 非常适合作为

收稿日期: 2013-11-10

基金项目: 国家 973 项目 (2011CB200901); 国家 863 计划项目 (2013AA065802); 国家自然科学基金 (31370383); 国家海洋局海洋可再生资源专项资金资助项目 (GHME2011SW04)

作者简介: 魏东 (1966-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事工业生物技术研究开发; 熊爽 (1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向为微藻生物技术

原生质体制备和再生、基因改造和细胞融合等研究的材料。为此,了解对数期藻细胞的生化组成特性,尤其是碳氢化合物的组成和含量是否影响上述应用至关重要。然而,对数期葡萄藻胞内的碳氢化合物含量不高,且组成复杂,对碳氢化合物的提取和测定提出了更高的要求。本研究针对微量葡萄藻冻干粉中提取碳氢化合物的方法以及 GC-MS 分析条件进行优化,采用 NIST 数据库检索并确定化合物的结构,面积归一化法计算其百分含量^[4],为确立简单、高效的提取和分析葡萄藻中碳氢化合物的方法、合理利用葡萄藻资源提供了依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料和仪器

葡萄藻 (*Botryococcus sudeticus* UTEX 2629, 简称 UTEX 2629) 购自美国 UTEX 藻种库。三十烷 (triacontane) 标准品购自美国 Sigma 公司; 二氯甲烷、正己烷、丙酮、氯仿和甲醇等色谱纯试剂购自北京迪马科技公司。Milli-Q 超纯水机, 美国 Millipore 公司; 6890-5975 气相色谱-质谱联用仪, 美国 Agilent 公司; Modulyod 冷冻干燥机, 美国 Thermo 公司; Sunrise 酶联免疫检测仪, 奥地利 Tecan 公司; KBS-250 超声波清洗器, 购自昆山超声设备公司; DHG-9123A 电热恒温鼓风干燥箱, 上海一恒科学仪器有限公司; BS224S 精密电子天平, 德国 Sartorius 科学仪器公司; HGC-12A 氮气吹干仪, 上海楚定分析仪器有限公司; QL-901 漩涡振荡混合器, 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司; THZ-82 恒温水浴振荡器, 江苏省金坛市宏华仪器厂; Allegra 25R 台式高速冷冻离心机, 美国贝克曼库尔特 (Beckman Coulter) 有限公司。

1.2 研究方法

1.2.1 葡萄藻培养与生长情况测定

UTEX 2629 的培养基采用 Modified Bold 3N Medium^[5]。将培养到对数生长期的藻种按 20%(V/V) 的接种量接种到装有 100 mL 无菌培养基的 250 mL 三角瓶中, 在 25 °C、光照强度约 4000 lux、转速为 130 r/min 下振荡培养。当藻液浓度达到 OD₆₉₀ 为 0.6 (对数期) 时, 5000 r/min 离心 15 min 收集细胞, 水洗 2 次后冷冻干燥备用。

每 2 天取样一次, 3 个平行培养瓶, 每瓶取样 200 μ L 测定 OD₆₉₀, 并计算其比生长速率, 公式为:

比生长速率:

$$\mu = (\ln OD_2 - \ln OD_1) / t$$

注: OD₂ 和 OD₁ 分别是实验结束和开始时测得的 OD₆₉₀ 值, t 为两次取样间隔的培养时间 (d)。

1.2.2 碳氢化合物提取方法比较

1.2.2.1 提取溶剂的选择

本研究以丙酮为对照溶剂, 与氯仿-甲醇 (2:1, V/V) 和正己烷为溶剂进行系统比较。丙酮提取法主要步骤如下: 称取 40 mg 冻干藻粉置于 10 mL 螺口试管中, 加入 50 μ L、含有 1 mg/mL 三十烷内标^[6]的二氯甲烷溶液, 用高纯氮气吹干后加入 10 mL 丙酮, 漩涡混合均匀, 管口密封好, 于 35 °C、70 Hz 条件下超声提取 30 min, 接着在 35 °C 下水浴 10 h, 然后取出螺口试管, 用高纯氮气吹干后再加入 1.5 mL 正己烷复溶, 于 15 °C、3500 r/min 离心 5 min, 分层, 用 1 mL 注射器将上层提取物吸出, 通过 0.22 μ m 有机系过滤器过滤到进样瓶中。密封保存于 -18 °C 冰箱中, 待 GC-MS 分析。

氯仿-甲醇和正己烷提取法是将提取溶剂分别更换成氯仿-甲醇 (2:1, V/V) 或正己烷, 步骤相同。系统比较获得的碳氢化合物的种类、含量、纯度和溶剂的毒性后确定最佳提取溶剂。

1.2.2.2 提取温度的选择

采用上节中筛选出的最佳溶剂进行提取温度的优化, 超声和水浴的温度以 35 °C 作为对照, 与 20 °C 和 50 °C 的提取效果进行系统比较。

1.2.2.3 提取时间的选择

在最佳提取溶剂和提取温度下, 选择合适的提取时间, 以 4 h 为对照, 与 7、10 和 13 h 的提取效果进行系统比较。

提取效果主要以 GC-MS 分析获得的碳氢化合物的种类、含量和纯度进行比较, 同时考虑操作的难易程度、实验耗材等因素, 最终确定最佳提取条件。

1.2.3 GC-MS 分析条件比较

按照 1.2.1 中得出的最佳提取条件制备碳氢化合物样品, 色谱分析采用 Agilent 19091S-433 HP-5 MS 弱极性毛细管柱 (30 m \times 250 μ m \times 0.25 μ m, 5% Phenyl Methyl Siloxane), 载气 (He) 流速为 1.0 mL/min, 压力 6.2 \times 10⁴ Pa, 进样口温度 240 °C, 进样量 4 μ L; 分流比 1:1。质谱条件采用电子轰击 (EI) 离子源, 电子能量 70 eV, 传输线温度 290 °C, 离子源温度 230 °C; 四极杆温度 150 °C, 电离电压 1565 V; 质量扫描范围 m/z 40~600。

对分析碳氢化合物样品的升温程序进行四次优化:

升温程序 1: 初始柱温 130 °C, 以 20 °C/min 升至 270 °C, 再以 2 °C/min 升至 300 °C, 保持 8 min^[7];

升温程序 2: 初始柱温 130 °C, 保持 5 min, 以 8 °C/min 升至 200 °C, 保持 2 min, 再以 5 °C/min 升至

280 °C, 保持20 min^[8];

升温程序3: 初始柱温80 °C^[9], 保持1 min, 以8 °C/min升至130 °C, 保持2 min, 再以5 °C/min升至160 °C, 保持2 min, 接着以3 °C/min升至200 °C, 保持5 min, 最后以2 °C/min升至280 °C, 保持5 min;

升温程序4: 初始柱温130 °C, 保持5 min, 以5 °C/min升至200 °C, 保持5 min, 再以3 °C/min升至280 °C, 保持10 min。

按上述条件对各样品进行分离鉴定, 根据GC-MS所得的质谱信息, 经与NIST05标准谱库相匹配, 对其成分进行定性鉴定, 仅报告相似指数(SI)大于80的化合物。定量分析采用内标法: 以50 μg三十烷为内标, 以面积归一化法测得提取物各组分的相对含量, 再根据各组分相对于三十烷内标的峰面积来计算各组分的绝对含量。各组分占藻粉质量的百分数的计算公式如下:

$$\text{碳氢化合物}(\% \text{干重}) = \frac{[\text{碳氢化合物}(\% \text{总组分}) / \text{三十烷}(\% \text{总组分})] \times 50(\mu\text{g}) \times 10^{-3}}{\text{藻粉干重}(\text{mg})} \times 100\%$$

2 结果与讨论

2.1 葡萄藻 UTEX 2629 的生长曲线测定

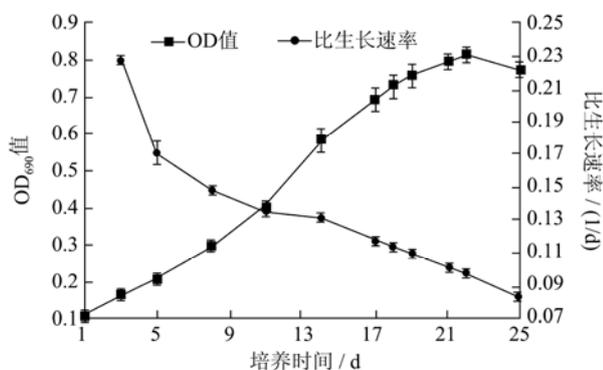


图1 葡萄藻 UTEX2629 的生长曲线

Fig.1 The growth curve of *Botryococcus sudeticus* UTEX 2629

葡萄藻 UTEX 2629 的生长曲线见图1。由图1可

知, 培养至22 d, 细胞OD₆₉₀达到最大值0.82之前均呈现上升趋势。比生长速率随着培养时间的延长而迅速下降, 在培养的前5 d, 比生长速率下降最快, 最大比生长速率为0.23 d⁻¹; 从第11 d到第14 d, 比生长速率基本不变, 从第14 d开始, 比生长速率又直线下降。可见, 第11至14 d的细胞生长状况稳定, 达到对数中期, 且第14 d时细胞数量足够, OD₆₉₀达到0.6。因此选择OD₆₉₀ 0.6左右的细胞进行研究。

2.2 提取溶剂的选择

采用3种溶剂所提取的碳氢化合物, 按照1.2.3中升温程序3的方法分析组成和含量, 结果列于表1中(仅列出了相似度≥80%的碳氢化合物)。GC-MS分析得到总离子流图, 各种成分的峰尖且窄, 相邻峰均完全得到分离, 说明所用条件适合碳氢化合物分离, 但三种溶剂提取的各成分有明显差异。

表1 3种溶剂提取的碳氢化合物组成和含量

Table 1 Composition and content of the hydrocarbons extracted by three kinds of solvent

出峰时间	物质名称	分子式	碳氢化合物含量(mg/g 干重)		
			丙酮	氯仿/甲醇(2:1, V/V)	正己烷
4.22	1,2-二乙苯	C ₁₀ H ₁₄	282.54±10.98	-	-
4.583	2-乙基对二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	146.45±5.61	-	-
4.647	4-乙基邻二甲苯	C ₁₀ H ₁₄	164.48±6.37	-	-
5.156	1,2,4,5-四甲苯	C ₁₀ H ₁₄	244.15±9.44	-	-
6.186	萘	C ₁₀ H ₈	59.05±3.39	-	-
6.307	十二烷	C ₁₂ H ₂₆	-	181.12±8.43	-
6.352	五甲基苯	C ₁₁ H ₁₆	18.96±1.32	-	-
7.217	1,3-二叔丁基苯	C ₁₄ H ₂₂	-	33.12±2.11	-
14.87	十六烷	C ₁₆ H ₃₄	-	24.09±0.73	-
16.843	7-十七碳烯	C ₁₇ H ₃₄	-	270.52±14.71	-
17.46	十七烷	C ₁₇ H ₃₆	26.49±4.25	630.44±20.95	-
21.709	顺式蒎烷	C ₁₀ H ₁₈	53.69±3.10	-	-
24.572	十三碳一烯-6-炔	C ₁₃ H ₂₀	18.71±0.82	-	-
24.922	(E)-3-Tetradecen-5-yne	C ₁₄ H ₂₄	-	102.37±6.87	-

转下页

接上页						
26.634	10-甲基十九烷	C ₂₀ H ₄₂	9.22±1.14	-	-	-
29.108	(Z)-2-Pentadecen-4-yne	C ₁₅ H ₂₆	-	57.44±4.70	-	-
32.703	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	31.54±0.62	-	-	50.40±2.77
40.961	二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	63.43±3.41	-	-	209.17±14.70
45.103	二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	-	-	-	351.45±10.55
49.021	9-辛基十七烷	C ₂₅ H ₅₂	-	-	-	472.38±20.80
52.705	二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	-	-	-	540.48±21.79
52.773	二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	-	-	-	542.24±18.49
57.069	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	365.86±7.27	915.32±30.39	-	473.60±4.63
66.237	正三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	-	-	-	306.86±9.43
碳氢化合物总量(mg/g 干重)			1484.57±57.72	2214.42±88.89	-	2946.58±103.16

注：“-”标识为含量<5 μg/g干重的成分。

由表1可见,采用丙酮为溶剂、超声提取的样品中分离出54种组分,鉴定出26种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的50.01%),其中碳氢化合物13种(占藻粉干重的1.48%),脂肪烃就有7种(占藻粉干重的0.57%)。采用氯仿/甲醇(2:1, V/V)为溶剂、超声提取的样品中共分离出66种组分,鉴定出40种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的80.81%),其中碳氢化合物8种(占藻粉干重的2.21%),脂肪烃就有7种(占藻粉干重的2.18%),极显著高于丙酮提取出的碳氢化合物含量(p<0.01)。

采用正己烷为溶剂、超声提取的样品中分离出63种组分,鉴定出20种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的64.21%),其中碳氢化合物8种(占藻粉干重的2.95%)且其全部为脂肪烃,显著高于氯仿/甲醇(2:1, V/V)提取出的碳氢化合物含量(p<0.05)。

详细分析碳氢化合物组成可知:丙酮提取物中主要是芳烃、少量C₁₀~C₁₃中链烃和少量C₁₇~C₃₀长链烃,含量分别为915.63 μg/g、98.89 μg/g和470.54 μg/g干重;氯仿/甲醇(2:1, V/V)的提取物中主要是C₁₂~C₁₇中链烃(1299.10 μg/g)和角鲨烯(915.32 μg/g);正己烷的提取物中主要是C₂₂~C₃₁碳长链烃(2946.58 μg/g)。综合比较可知,采用非极性溶剂正己烷提取较为合适,可获得大量极性很弱的C₂₂~C₃₁长链烷烃;丙酮极性较强,其提取物中极性物质如芳烃含量增多;氯仿/甲醇(2:1, V/V)为极性不同的氯仿和甲醇混合组成的二元溶剂,其提取物中含有不同极性的组分且其组分种类最多。

已有研究表明,丙酮超声法^[10]、氯仿/甲醇(2:1, V/V)提取法^[11]、正己烷超声^[12]均已用于葡萄藻中碳氢化合物的提取。本研究结果表明,虽然氯仿/甲醇(2:1, V/V)超声提取的成分最多,但其碳氢化合物含量较低;丙酮超声提取的碳氢化合物种类最多但多数为芳香

烃,且丙酮具有较大的刺激性;正己烷超声提取的脂肪烃含量最多,占藻粉干重的2.95%,且正己烷低毒、刺激性气味小。因此,在综合考虑极性、毒性和后续处理中的难易程度等因素后,选择正己烷作为提取葡萄藻UTEX 2629碳氢化合物的优选溶剂。此外,也有研究比较了二甲醚和正己烷提取的碳氢化合物组成^[13],发现二甲醚提取到了B族布朗葡萄藻中含有较多C₃₂~C₃₄烃,而正己烷除了提取C₃₂~C₃₄烃外,还提取到了含量较少的C₃₀和C₃₁烃,与本研究结果一致。

2.3 提取温度的选择

本研究采用上节中筛选获得的正己烷为提取溶剂进行提取温度优化,其中超声和水浴温度均改为设置的提取温度,GC/MS分析采用1.2.3中升温程序3。不同温度下提取的碳氢化合物组成和含量比较结果见表2。由表2可知,20℃下正己烷提取物中分离出33种组分,鉴定出10种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的49.01%),其中碳氢化合物6种(占藻粉干重的1.62%且其全部为脂肪烃)。35℃下提取物中分离出63种组分,鉴定出20种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的64.22%),其中碳氢化合物8种(占藻粉干重的2.95%),显著高于20℃下碳氢化合物含量(p<0.05)。50℃下提取物中分离出85种组分,鉴定出33种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的59.53%),其中碳氢化合物11种(占藻粉干重的3.05%),与35℃下获得的提取物之间没有显著性差异。

综合分析表明,20℃与35℃相比,提取得到的碳氢化合物种类及含量变化较大,这是因为温度的升高加速了分子运动速率,有利于溶剂渗透到细胞中从而使大量内溶物析出,使得碳氢化合物的提取率提高;50℃时提取的碳氢化合物含量比35℃时略高但杂质组分也增多,极性较强的成分溶出量增加,过多的杂

质可能会对碳氢化合物的分离产生干扰或使其检出率下降。因此, 35 °C是较适宜的提取温度。有研究用正己烷/丙酮(3:1, V/V)提取布朗葡萄藻BOT-22中的碳氢化合物并进行GC-MS分析, 24 °C下提取24 h, 提取

出了C₄₀H₅₆^[8]。但本研究中所用的提取温度与之不同, 这是由于藻种和生长时期不同, 其所含的碳氢化合物种类和含量以及提取难易程度不同, 因此提取条件也应有差异。

表2 不同温度下提取的碳氢化合物组成和含量

Table 2 Composition and content of hydrocarbons extracted under different temperatures

出峰时间	物质名称	分子式	碳氢化合物含量(mg/g 干重)		
			20 °C	35 °C	50 °C
4.793	十一烷	C ₁₁ H ₂₄	-	-	71.70±2.46
6.307	十二烷	C ₁₂ H ₂₆	36.35±1.53	-	154.27±5.30
10.099	十四烷	C ₁₄ H ₃₀	50.60±1.71	-	-
14.87	十六烷	C ₁₆ H ₃₄	-	-	24.23±1.27
16.843	7-十七碳烯	C ₁₇ H ₃₄	76.40±2.78	-	110.31±3.59
17.46	十七烷	C ₁₇ H ₃₆	204.92±9.77	-	374.21±12.97
21.709	顺式萘烷	C ₁₀ H ₁₈	-	-	243.85±9.45
24.979	环癸二烯	C ₁₀ H ₁₆	385.12±14.38	-	-
26.634	10-甲基十九烷	C ₂₀ H ₄₂	-	-	145.91±7.24
30.68	7-十六烯	C ₁₆ H ₃₀	-	-	188.36±8.95
32.703	二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	-	50.40±2.77	-
40.961	二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	-	209.17±14.70	-
45.103	二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	-	351.45±10.55	-
49.021	9-辛基十七烷	C ₂₅ H ₅₂	-	472.38±20.80	-
51.942	双环三十烯	-	-	-	58.83±4.88
52.705	二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	-	540.48±21.79	83.23±3.77
52.773	二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	-	542.24±18.49	-
57.069	角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	866.61±10.25	473.60±4.63	1593.01±50.90
66.237	正三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	-	306.86±9.43	-
碳氢化合物总量(mg/g 干重)			1620±40.42	2946.58±103.16	3047.91±110.78

注: “-”标识为含量<5 μg/g干重的成分。

2.4 提取时间的选择

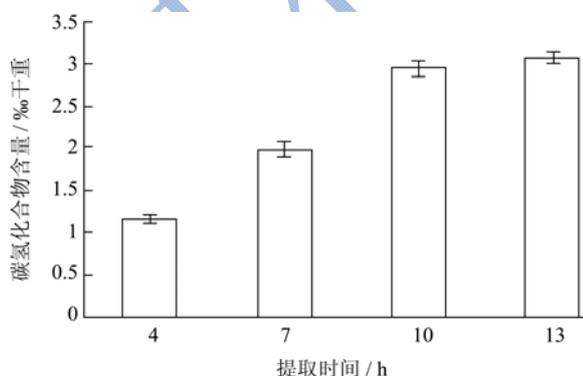


图2 不同时间提取的碳氢化合物含量

Fig.2 Content of the hydrocarbons extracted by different time

本研究采用优化溶剂正己烷、优化提取温度35 °C为提取条件, 比较选择合适的提取时间。其中水浴时间改为4、7、10、13 h), GC-MS分析采用1.2.3中升温

程序3。不同提取时间下碳氢化合物含量比较结果见图2。由图2可知, 在各个提取时间获得的提取物中, 13 h提取物中碳氢化合物含量最高, 占藻粉干重的3.07%, 且其全部为脂肪烃, 但与10 h的碳氢化合物含量差异不显著 (p>0.05)。综合考虑能耗、时间和提取效率, 确定优化的提取时间为10 h。

2.5 升温程序的选择

采用上述优化提取条件(正己烷为溶剂, 35 °C下提取10 h)制备提取物样品, 按照1.2.3中设计的4种升温程序对GC-MS分析条件进行优化, 结果见表3。

升温程序1分离出62种组分, 鉴定出12种相似度≥80%的化合物(占总峰面积的69.43%), 其中碳氢化合物4种(占藻粉干重的2.33%), 且其全部为脂肪烃。但总离子流图在7 min左右出现严重拖尾, 证明该处升温太快, 使其中的成分无法分离开;

升温程序2分离出83种组分, 鉴定出18种相似度 $\geq 80\%$ 的化合物(占总峰面积的44.22%), 其中碳氢化合物8种(占藻粉干重的1.86‰), 且其全部为脂肪烃; 但出峰都集中在15 min到30 min之间, 峰过于集中, 影响了分辨率;

升温程序3分离出63种组分, 鉴定出20种相似度 $\geq 80\%$ 的化合物(占总峰面积的64.24%), 其中碳氢化合物8种(占藻粉干重的2.95‰), 且其全部为脂肪烃; 升温程序4分离出60种组分, 鉴定出16种相似度 $\geq 80\%$

的化合物(占总峰面积的34.35%), 其中碳氢化合物7种(占藻粉干重的1.56‰), 且其全部为脂肪烃。比较发现, 这两种升温程序得到的峰尖且窄, 相邻峰基本完全得到分离。可见, 在不同程序升温条件下, 总离子流图的出峰时间和峰形会有差异, 直接影响到样品所裂解产物的种类及含量。进一步比较可知, 升温程序4苯系物出峰较快且分离度会降低, 而升温程序3得到的碳氢化合物含量比升温程序4显著增加($p < 0.05$)。因此, 升温程序3用于分析碳氢化合物更为合适。

表3 4种升温程序分析碳氢化合物组成和含量

物质名称	分子式	碳氢化合物含量(mg/g 干重)			
		程序 1	程序 2	程序 3	程序 4
十七碳一烯	C ₁₇ H ₃₄	295.23±10.71	-	-	-
十七烷	C ₁₇ H ₃₆	420.43±20.02	103.76±3.18	-	88.06±2.71
十八烷	C ₁₈ H ₃₈	-	95.15±5.74	-	51.51±2.37
十九烷	C ₁₉ H ₄₀	69.87±4.59	-	-	95.60±4.17
二十烷	C ₂₀ H ₄₂	-	161.07±3.28	-	34.04±0.55
1-十九烯	C ₁₉ H ₄₀	-	-	-	107.59±6.40
二十二烷	C ₂₂ H ₄₆	-	-	50.40±2.77	-
二十三烷	C ₂₃ H ₄₈	-	-	-	52.65±1.27
二十四烷	C ₂₄ H ₅₀	-	114.01±4.07	209.17±14.70	-
二十五烷	C ₂₅ H ₅₂	-	107.92±1.93	351.45±10.55	-
9-辛基十七烷	C ₂₆ H ₅₄	-	69.92±2.05	472.38±20.80	-
二十七烷	C ₂₇ H ₅₆	-	-	540.48±21.79	-
二十八烷	C ₂₈ H ₅₈	-	99.61±5.78	542.24±18.49	-
角鲨烯	C ₃₀ H ₅₀	1543.22±67.11	1110.39±20.77	473.60±4.63	1132.47±35.96
正三十一烷	C ₃₁ H ₆₄	-	-	306.86±9.43	-
碳氢化合物总量(mg/g 干重)		2328±102.43	1861.83±46.80	2946.58±103.16	1561.92±53.43

注: “-”标识为含量 $< 5 \mu\text{g/g}$ 干重的成分。

3 结论

本研究通过系统比较和条件优化, 确定了提取葡萄藻对数期细胞内碳氢化合物的最佳提取溶剂、温度和时间, 以及GC-MS分析的最佳升温程序。该方法具有样品用量少、时间短、提取效率高、分析准确的特点。研究还发现, 正己烷提取出的C₂₂~C₃₁长链烃含量最高, 丙酮提取出的芳烃含量最高, 氯仿/甲醇(2:1, V/V)提取出的C₁₂~C₁₇中链烃的含量最高, 说明不同方法具有互补性, 在实际操作中, 可根据藻种和目标产物的不同选择合适的提取溶剂进行选择提取^[14], 或将不同溶剂结合使用进行全组分分析, 其效果值得进一步深入研究。

参考文献

- [1] Palligarnai T V, Michael B. Biodiesel production-current state of the art and challenges [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(5): 421-430
- [2] Scott S A, Davey M P, Dennis J S, et al. Biodiesel from algae: challenges and prospects [J]. Current Opinion Biotechnology, 2010, 21(3): 277-286
- [3] 马梅,王朋云. 布朗葡萄藻培养方面的研究概况[J]. 现代农业科技, 2008, 15: 35-38
MA Mei, WANG Peng-yun. Research overview of Botryococcus braunii cultivation [J]. Modern Agricultural Science and Technology, 2008, 15: 35-38
- [4] 王玲, 司徒绮文. 春砂仁挥发性成分的提取和检测[J]. 现代食品科技, 2010, 26(9): 1031-1034
WANG Ling, SITU Qi-wen. Extraction and determination of volatile components in amomum villosum Lour [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(9): 1031-1034
- [5] Largeau C, Casadevall E, Berkaloff C, et al. Sites of accumulation and composition of hydrocarbons in Botryococcus braunii [J]. Phytochemistry, 1980, 19(6): 1043-1051
- [6] Yonezawa N, Matsuura H, Shiho M, et al. Effects of soybean

- curd wastewater on the growth and hydrocarbon production of *Botryococcus braunii* strain BOT-22 [J]. Bioresource Technology, 2012, 109: 304-307
- [7] Hiroshi M, Makoto M W, Kunimitsu K. Echinenone production of a dark red-coloured strain of *Botryococcus braunii* [J]. Journal of Applied Phycology, 2012, 24(4): 973-977
- [8] Dayananda C, Sarada R, Srinivas P, et al. Presence of methyl branched fatty acids and saturated hydrocarbons in botryococcene producing strain of *Botryococcus braunii* [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2006, 28(3): 251-256
- [9] Zhang Z H, Metzger P, Sachs P. Biomarker evidence for the co-occurrence of three races (A, B and L) of *Botryococcus braunii* in El Junco Lake, Galapagos [J]. Organic Geochemistry, 2007, 38(9): 1459-1478
- [10] Sim S J, An J Y, Kim B W. Two-phase extraction culture of *Botryococcus braunii* producing long-chain unsaturated hydrocarbons [J]. Biotechnology Letters, 2001, 23: 201-205
- [11] Kojima E, Zhang K. Growth and hydrocarbon production of microalga *Botryococcus braunii* in bubble column photobioreactors [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 1999, 87(6): 811-815
- [12] Zhang H F, Wang W L, Li Y G, et al. Mixotrophic cultivation of *Botryococcus braunii* [J]. Biomass and Bioenergy, 2011, 35(5): 1710-1715
- [13] Kanda H, Li P, Yoshimura T, et al. Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane [J]. Fuel, 2013, 105: 535-539
- [14] 姜明华,姜建国,杨丽.不同方法提取代代花中挥发油成分的GC-MS分析[J].现代食品科技,2010,26(11):1271-1279
JIANG Ming-hua, JIANG Jian-guo, YANG Li. GC-MS analysis of volatile oils of the flower of citrus aurantium L var. amara engl using three different methods [J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(11): 1271-1279