

沼气发酵液中易挥发性酸的气相色谱分析方法

庞月川

(中国科学院微生物研究所,北京)

沼气发酵液中的易挥发性酸,对于它的定量分析,在甲酯化方面,目前尚无一个完美的方法,或者操作过程繁杂,或者样品中的酸有损失,给定量分析带来一定的困难。采用在乙醚液中脂肪酸与四甲基氢氧化铵成盐的方法,样品损失少,加之标准样和未知样平行处理,进行校正因子的计算,使分析较为准确,简单易行。将体积较大的乙醚液中的脂肪酸,通过成盐反应,集中到体积很小的水层中,起到浓缩的作用,需要样品量相应减少。此方法对各种微生物发酵所产生的易挥发性酸的定量分析,均有一定的使用价值。

(一) 试剂: C_1-C_6 饱和脂肪酸的标准样; 1% 酚酞的甲醇溶液; 10% 的四甲基氢氧化铵水溶液; 分析纯的乙醚; 6N 的盐酸。

(二) 方法

1. 样品的来源及前处理: ①标准脂肪酸样品乙醚液的配制: 按等体积比配成总酸量为 1% 的 C_1-C_6 脂肪酸的水溶液 50ml, 在 250ml 的分液漏斗内将此溶液用 50ml 乙醚分别提取 3 次, 所得乙醚溶液合并, 挥发至 25ml 待用。②脂肪酸未知样品的来源及制备: 此样品由本所沼气发酵组提供。取沼气发酵 24、48、72、96、120 和 144 小时的发酵液各 50 ml, 均用 6N 盐酸调至 pH 2 左右, 各用 50ml 乙醚分别提取 3 次, 将 3 次乙醚液分别合并, 均挥发至 25ml。③成盐反应: 取①和②中乙醚液各 15ml, 分别放入带塞的试管内, 各加入一滴 1% 的酚酞甲醇液, 然后向其中滴加 10% 的四甲基氢氧化铵水溶液, 不断振荡试管, 直至水层的红色不消失。此样品待气相色谱分析。

2. 气相色谱分析: 条件: SP-2305 型色谱仪, 氢火焰离子化检测器, 8% 的 SE-30 做固定液, 白色硅烷化 60—80 目 101 担体, 柱长 2.0m, 内径 4mm, 柱温 110℃, 气体流量: N_2 : 29.5ml/分、 H_2 : 20.5ml/分、空气: 195ml/分, 仪器的

灵敏度: 恒温时 $Mf \leq 1 \times 10^{-10} g/sec$ 。

校正因子的测定: 长链脂肪酸由于沸点较高, 损失少, 它们的校正因子又很接近, 可直接用峰面积做定量计算。 C_1-C_6 的脂肪酸, 校正因子差别较大, 仅用峰面积做定量计算误差较大, 需要测定校正因子, 因为 C_1-C_6 的脂肪酸在整个处理过程中, 会有损失, 与色谱手册查到的校正因子不能重复, 需要将标准样和发酵样品平行处理, 使校正因子更接近实际情况。将样品的前处理③中的标准样进行色谱分析, 得到各脂肪酸甲酯组份的色谱峰。根据公式:

$$S_{wi} = \frac{A_i/W_i}{A_s/W_s}$$

即:
$$f_{wi} = \frac{A_i \cdot W_i}{A_s \cdot W_s} \quad (1)$$

其中: $W_i = V_i \cdot D_i$ $W_s = V_s \cdot D_s$

(1) 式中可写成

$$f_{wi} = \frac{A_i \cdot V_i \cdot D_i}{A_s \cdot V_s \cdot D_s} \quad (2)$$

C_1-C_6 的脂肪酸标准溶液是按各组份等体积配成的

(2) 式可写成

$$f_{wi} = \frac{A_i \cdot D_i}{A_s \cdot D_s} \quad (3)$$

根据公式(3), 以己酸甲酯做标准, 所得各脂肪酸甲酯组份对己酸甲酯的校正因子 f_{wi} 列入表 1。

A_s, A_i 分别为选定的测校正因子的标准组份 s 和组份 i 的峰面积(峰高 \times 保留时间);

W_s, W_i 分别为 s 和 i 组份的重量;

V_s, V_i 分别为 s 和 i 组份的体积;

D_s, D_i 分别为 s 和 i 组份的比重;

f_{wi} 为 i 组份对 s 组份的相对重量校正因子。

发酵液中各脂肪酸组份百分含量的测定: 首先把样品前处理③中未知样品进行色谱定性

表 1 正构 C₁—C₆ 脂肪酸甲酯对己酸甲酯的校正因子

| 脂肪酸的组份 | | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|---------|-----|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 测得的校正因子 | 第一次 | 6.90 | 2.00 | 1.28 | 1.01 | 1.02 | 1.00 |
| | 第二次 | 7.73 | 2.20 | 1.30 | 1.02 | 1.03 | 1.00 |
| | 第三次 | 7.23 | 2.34 | 1.41 | 1.09 | 1.09 | 1.00 |
| | 第四次 | 7.96 | 2.28 | 1.35 | 1.08 | 1.07 | 1.00 |
| | 平均 | 7.46 | 2.21 | 1.34 | 1.05 | 1.05 | 1.00 |

分析,然后根据样品的组份不同,选择适当的内标物己酸或戊酸,分别向各样品中加入 10μl 的己酸或戊酸,如样品的水层变为无色,再向内滴加四甲基氢氧化铵水溶液,使它刚刚变红而不褪色。将此样品再进行色谱定量分析。根据下列公式进行定量计算:

$$W_{内}\% = \frac{V_{内} \cdot f_{W内} \cdot V_Z}{V_Z' \cdot V_{发酵}} \quad (4)$$

$$W_i\% = W_{内}\% \times \frac{A_i \cdot f_{Wi}}{(A'_{内} - A''_{内})f_{Wi内}} \quad (5)$$

W_内% 和 W_i% 分别为内标物和 i 组份在发酵液中的重量百分比浓度;

V_内 和 V_{发酵} 分别为加入样品中内标物的体积和所取发酵液的体积;

V_Z 和 V_{Z'} 分别为抽提样品所用乙醚浓缩后的体积和用于成盐反应的样品乙醚液的体积;

A'_内 为内标物和样品中与内标物相同组份的峰面积之和;

A''_内 为样品中与内标物相同组份的面积。

分析结果与该沼气发酵的规律是吻合的,结果列入表 2。

方法比较:四甲基氢氧化铵与脂肪酸成盐的方法,应用比较广泛,但二者在乙醚液中成盐还未见报道,因此做了两种成盐方法的比较。取 C₁—C₆ 脂肪酸各 1ml,混合摇匀。取两支带塞的试管,分别加入 10μl 的该脂肪酸混合液,将其中一支试管再加入 15ml 乙醚振荡,使脂肪酸完全溶于乙醚,然后将两支试管中的样品与四甲基氢氧化铵成盐后,进行色谱分析。结果列入表 3。

从表 3 中的数据可看出乙醚的存在并不影响四甲基氢氧化铵与脂肪酸的成盐反应。

脂肪酸的甲酯化方法很多,根据样品中含脂肪酸成份的不同,选用较适宜的酯化方法是必要的,下面将经常用的几种酯化方法做一比较列入表 4。

表 2 不同发酵时间发酵液中各酯脂肪酸组份的变化

| 发酵时间(小时) | 发酵液中各脂肪酸组份的百分含量(%) | | | | |
|----------|--------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
| 24 | 0.0770 | 0.0076 | 0.1300 | 0.0400 | 0.2500 |
| 48 | 0.0808 | 0.0264 | 0.1497 | 0.0449 | 0.2829 |
| 72 | 0.0963 | 0.0376 | 0.1703 | 0.0246 | 0.1893 |
| 96 | 0.0670 | 0.0769 | 0.0145 | 0.0099 | 0.0027 |
| 120 | 0.0380 | 0.0290 | 0.0023 | 0.0023 | 微量 |
| 144 | 0.0110 | 0.0060 | 0.0005 | 0.0007 | — |

表 3 脂肪酸与四甲基氢氧化铵在乙醚中和不在乙醚中成盐的比较

| 百分比* (%) | C ₁ | C ₂ | C ₃ | C ₄ | C ₅ | C ₆ |
|---------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 酯化方法 | | | | | | |
| 脂肪酸与四甲基氢氧化铵成盐 | 7.6 | 10.8 | 15.1 | 21.9 | 22.3 | 22.3 |
| 在乙醚溶液中脂肪酸与四甲基氢氧化铵成盐 | 9.1 | 10.1 | 16.5 | 21.3 | 21.5 | 21.6 |

* 样品中各脂肪酸组份的峰面积占总峰面积的百分比

表 4 常用酯化方法的比较

| 酯化方法 | 酯化过程 | 样品用量 | 样品的前处理 | 样品损失量 | 对人体的影响 |
|----------------|------------------|------|------------|-------|--------|
| 硫酸-甲醇法 | 时间长 | 较大 | 蒸掉抽提酸的乙醚 | 较大 | 毒性小 |
| 重氮甲烷法 | 制备亚硝甲基脒时间长,需要冰盐浴 | 小 | 同 上 | 较大 | 毒性大 |
| 四甲基氢氧化铵法 | 时间短,操作简单 | 小 | 同 上 | 较小 | 毒性小 |
| 乙醚存在下的四甲基氢氧化铵法 | 时间短,操作简单 | 小 | 不用蒸掉抽提酸的乙醚 | 较小 | 毒性小 |

(三) 讨论: 1. 样品的前处理,根据发酵液中酸的浓度而定。如果浓度较大,乙醚提取液不必浓缩,可直接取乙醚抽提液进行成盐反应。如果发酵液中酸浓度很小,则把乙醚抽提液适当浓缩,在这种情况下,用来做校正因子的标准样,处理过程一定和未知样品相平行。

2. 从表 3 可以看出, C₁—C₃ 脂肪酸甲酯组份的峰面积与总脂肪酸甲酯的峰面积的百分比

小,这可能是在进样过程中,脂肪酸甲酯有些损失。对于甲酸,据有的报道说它在氢焰离子化检测器上分析不灵敏,不知甲酸甲酯在氢焰离子化检测器上是否也不灵敏,导致它的峰面积尤其小,在这一点上没有具体探讨。

参 考 文 献

[1] 吉林化学工业公司研究院编: 气相色谱实用手册, 化