



BSI 标准出版物

藻类和藻类产品 取样和分析方法 用 Ryckebosch-Foubert 法测定总脂质含量

国家序言

该英国标准是 EN 17908:2023 在英国的实施。

英国委托藻类和藻类产品技术委员会 EH/3/-/5 参与其准备工作。

可以向委员会经理索取参加该委员会的组织名单。

合同和法律考虑

本出版物是本着善意编写的,但是,BSI 不会做出任何陈述、保证、保证或承诺(明示或暗示),并且 BSI 不会或不会就其充分性、准确性和完整性承担任何责任或义务。或本出版物的合理性。在法律允许的最大范围内,明确否认所有及任何此类责任和义务。

本出版物按原样提供,收件人需自行承担使用风险。

建议接收者考虑在使用本出版物时寻求专业指导。

本出版物无意构成合同。用户应对其正确应用负责。

© 英国标准协会 2023

BSI 标准有限公司发布 2023

国际标准书号 978 0 539 22967 7

ICS 13.020.55

遵守英国标准并不能免除法律义务。

本英国标准于 2023 年 12 月 31 日在标准政策和战略委员会的授权下发布。

自出版以来发布的修正案/勘误

日期

受影响的文本

欧洲标准

EN 17908

欧洲标准

欧洲规范

2023 年 12 月

ICS 13.020.55

英文版

藻类和藻类产品。取样和分析方法。用

Ryckebosch-Foubert方法

Algues et produits d algues - 方法和分析 -
测定方法中的脂质总量

里克博什-福伯特

Algen 和 algenbasierte 产品或服务
Zwischenprodukte - Verfahren zur Probenahme 和
分析 - Bestimmung von Gesamtlipiden mit der
里克博斯-福伯特-方法

该欧洲标准于 2023 年 11 月 6 日获得 CEN 批准。

CEN 成员有义务遵守 CEN/CENELEC 内部规定,该规定规定了在不做任何修改的情况下赋予本欧洲标准国家标准地位的条件。有关此类国家标准的最新列表和参考书目可通过向 CEN-CENELEC 管理中心或任何 CEN 成员申请获得。

该欧洲标准存在三个正式版本(英语、法语、德语)。由 CEN 成员负责将其翻译成自己的语言并通知 CEN-CENELEC 管理中心的任何其他语言的版本与正式版本具有相同的地位。

CEN成员包括奥地利、比利时、保加利亚、克罗地亚、塞浦路斯、捷克共和国、丹麦、爱沙尼亚、芬兰、法国、德国、希腊、匈牙利、冰岛、爱尔兰、意大利、拉脱维亚、立陶宛、卢森堡、马耳他、荷兰的国家标准机构, 挪威, 波兰、葡萄牙、北马其顿共和国、罗马尼亚、塞尔维亚、斯洛伐克、斯洛文尼亚、西班牙、瑞典、瑞士、土耳其和英国。



欧洲标准化委员会
欧洲标准化委员会
欧洲国家安全委员会

CEN-CENELEC 管理中心: Rue de la Science 23, B-1040 布鲁塞尔

内容	页
欧洲前言.....	3
介绍.....	4
1 范围.....	5
2 规范性参考文献.....	5
3 术语和定义.....	5
4 原则.....	5
5 仪器.....	5
6 试剂和材料.....	6
7 采样和样品处理.....	6
8 程序.....	7
8.1 一般的.....	7
8.2 不破坏细胞的程序.....	7
8.2.1 概述.....	7
8.2.2 首次提取.....	7
8.2.3 第二次提取.....	8
8.3 细胞破碎程序.....	9
8.3.1 概述.....	9
8.3.2 首次提取.....	9
8.3.3 第二次提取.....	10
9 计算.....	12
10 质量控制.....	12
10.1 概述.....	12
10.2 实验室间重现性.....	12
11 测试报告.....	13
附件 A (资料性)实验室间试验和循环法的结果.....	14
A.1 介绍.....	14
A.2 实验室间试验的结果.....	14
A.3 循环赛结果.....	17
附录B (资料性附录)氯仿使用说明.....	19
B.1 介绍.....	19
B.2 用二氯甲烷替代氯仿的可能性.....	19
参考书目.....	20

欧洲前言

本文件 (EN 17908:2023)由 CEN/TC 454 “藻类和藻类产品”技术委员会编写,其秘书处由 NEN 担任。

本欧洲标准应最迟在 2024 年 6 月之前通过发布相同文本或通过认可的方式获得国家标准的地位,相冲突的国家标准最迟应在 2024 年 6 月之前撤销。

请注意本文件的某些要素可能是专利权的主题。CEN 不负责识别任何或所有此类专利权。

本文件是根据欧盟委员会向 CEN 提出的标准化要求而编写的。欧洲自由贸易联盟国家常务委员会随后批准了其成员国的这些请求。

有关本文件的任何反馈和问题应直接提交给用户的国家标准机构。
这些机构的完整列表可以在 CEN 网站上找到。

根据CEN-CENELEC内部规定,下列国家的国家标准组织有义务执行本欧洲标准:奥地利、比利时、保加利亚、克罗地亚、塞浦路斯、捷克共和国、丹麦、爱沙尼亚、芬兰、法国、德国、希腊、匈牙利、冰岛、爱尔兰、意大利、拉脱维亚、立陶宛、卢森堡、马耳他、荷兰、挪威、波兰、葡萄牙、北马其顿共和国、罗马尼亚、塞尔维亚、斯洛伐克、斯洛文尼亚、西班牙、瑞典、瑞士、土耳其和英国。

介绍

一般的

欧洲标准化委员会 (CEN) 应欧盟委员会 (EC) 的要求起草欧洲标准或欧洲标准化交付成果,以支持关于藻类和藻类产品或中间体的 2009/28/EC 指令第 3 条的实施。

这一请求以 M/5471 号指令提出,也有助于“创新促进可持续增长:欧洲生物经济”。

前工作组 CEN 技术委员会工作组 218 “藻类”成立于 2016 年,旨在制定一项工作计划,作为该任务的一部分。CEN/TC 454 “藻类和藻类产品”技术委员会的成立是为了开展制定一系列标准的工作计划。

在欧洲,人们对藻类和藻类产品或中间体的兴趣显着增加,作为一种有价值的来源,包括但不限于碳水化合物、蛋白质、脂质和多种色素。

这些材料适用于从食品和饲料用途到其他领域的广泛应用,例如纺织品、化妆品、生物聚合物、生物燃料和肥料/生物刺激剂。标准化被认为在促进藻类和藻类产品的使用方面具有重要作用。

CEN/TC 454 的工作应提高供应链的可靠性,从而提高

行业和消费者对藻类 (包括大型藻类、微藻类、蓝藻、迷宫菌、藻类产品或中间体) 的信心,并将促进和支持欧洲藻类产业的商业化。

与方法相关的考虑因素

藻类界的一个目标是建立一种公认的标准化方法来测定藻类中的总脂质。目前还有其他方法用于特定领域 (例如食品和饲料以及非食品和非饲料应用) 中使用的总脂质含量测定,每种方法在一个实验室使用时都会产生一致的结果,但很多时候不同实验室之间的结果不一致方法或实验室。

本文件的目的是定义一种合适的实验室分析方法,用于测定藻类中的总脂质。该方法也可以作为其他应用方法验证的参考方法。Ryckebosch-Foubert 方法测定微藻和大型藻类中的总脂质含量。当应用于脂质含量较低的藻类时,该方法的重现性较低。

1参见<https://ec.europa.eu/growth/tools-databases/mandates/index.cfm?fuseaction=refSearch.search#>

1 范围

本文件规定了通过 Ryckebosch-Foubert 法测定微藻和大型藻类中总脂质含量的实验室方法。

2 规范性引用文件

正文中引用下列文件时,其部分或全部内容构成本文件的要求。对于注明日期的参考文献,仅引用的版本适用。对于未注明日期的参考文献,适用参考文件的最新版本(包括任何修订)。

EN 17399,藻类和藻类产品 术语和定义

3 术语和定义

就本文件而言,EN 17399 中给出的术语和定义以及以下内容适用。

ISO 和 IEC 在以下地址维护用于标准化的术语数据库:

ISO在线浏览平台:<https://www.iso.org/obp> _____

IEC Electropedia:可在<https://www.electropedia.org/>获取_____

3.1

总脂质含量

在规定的操作条件下从测试部分中提取的所有脂质物质,以相对于干重的毫克/克表示

4 原理

用氯仿/甲醇提取干燥且均质的藻类生物质中的脂质(参见附录 B)。然后用水进行反萃取以除去非脂质。按照附录 A 中所述的优化方法,分别进行两相的两次连续萃取。除去溶剂后,通过重量分析法测定总脂质的量。

5 仪器

5.1 旋转蒸发器,包括真空度可调的真空泵

5.2 室温离心

5.3 涡流

5.4 分析天平,可读性为 0.01 mg

5.5 珠搅拌器(仅在使用程序 8.3 的情况下)

不同的珠打浆机和/或不同的细胞可能会导致不同的结果。因此,当使用程序 8.3 时,所使用的珠打机和电池的规格应在报告中注明。

6 试剂和材料

6.1 Pyrex®2螺旋盖管, 10 ml (每个测试部分一个单位)或类似的玻璃器皿

6.2 Pyrex®螺旋盖管, 20 ml (每个测试部分一个单位)或类似的玻璃器皿

6.3 漏斗 (每个测试部分一个单元)

6.4 180 µm 滤纸 (每个测试部分一张),例如Whatman 的滤纸,型号为nr. 1

6.5 巴斯德移液器, 2 ml (每个测试部分一个单位),例如钠钙玻璃,总长度为 145 mm 的非无菌移液器

6.6 圆底烧瓶,可用于旋转蒸发仪系统的分析天平 (不超过最大质量) (每个测试部分一个单位),在天平温度下 (以避免称重误差)

6.7 微量移液器

6.8 三氯甲烷 (纯度不低于体积分数99.0%)

6.9 甲醇 (纯度不低于体积分数99.0%)

6.10 氯仿/甲醇 (体积1/1)

6.11 无水硫酸钠

6.12 软化水

7 取样和样品处理

采样和样品处理不属于本文件规定的方法的一部分。EN 17605:2022 中给出了推荐的样品处理程序,并进行了以下修改/补充:

精磨应按照 EN 17605:2022 中 3.13 的规定进行;

运输应在干冰上进行;

储存温度应为-80°C。此外,大型藻类需要冷冻干燥。

应避免测试样品的长时间储存。如果无法避免,则测试样品在使用前应再次冷冻干燥。

应分析测试样品的三个测试部分,以便能够计算平均值和标准偏差。

² Pyrex®是合适的市售产品的示例。提供此信息是为了方便本文档的用户,并不构成 CEN 对本产品的认可。

8 程序

8.1 概述

在特定培养条件下培养的一些藻类可能具有高脂质含量和/或坚硬的细胞包膜,这使得在提取之前需要破坏细胞。程序 8.3 已针对这些情况制定。对于以前未分析过的物种或培养条件,应执行程序 8.2 和 8.3 并对结果进行比较。在这种情况下,首先执行两个程序 (8.2 无细胞破碎和 8.3 有细胞破碎)并比较结果。如果使用程序 8.3 的总脂质含量显著高于使用程序 8.2 的总脂质含量 (显著性水平:0.01),则继续对该样品使用程序 8.3,否则坚持 8.2。

始终结合此细胞破碎步骤是不合适的,因为对于大多数样品来说,这是不必要的,甚至会导致较低的值 (由于珠子的损失)和结果的更大变异性。它还意味着实验室中应该配备特殊仪器。

对于在标准培养条件下培养的所有标准藻类,无需细胞破碎步骤即可提取所有脂质,并且应使用程序 8.2。

8.2 不破坏细胞的程序

8.2.1 概述

不破坏细胞的程序应通过以下步骤进行。除称重外,整个过程应在通风柜下进行。

8.2.2 首次提取

- a) 在至少 10 ml 的 Pyrex® 螺旋盖管中称取约 100 mg 测试样品的测试部分 (即重量测试部分)。记录重量,精确到 0.01 毫克 (或 0.1 毫克,具体取决于分析天平的可读性);
- b) 加入 4ml 甲醇,然后加入 2ml 氯仿;
- c) 添加 0.4ml 软化水;
- d) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;
- e) 添加 2 ml 氯仿,然后添加 2 ml 软化水 (10 ml Pyrex®管现在完全填充);
- f) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;
- g) 450 g 离心管 10 分钟;
- h) 离心后形成两个溶剂相 (通常被生物质颗粒分开):除去用巴斯德吸管将上层移至废物容器;

注:该层是废物,含有糖、蛋白质和矿物质。
- i) 使用巴斯德移液器将下层转移至 20 ml Pyrex®螺帽管中。对于每个测试部分,应使用另一个巴斯德移液器。此移液器应保留在 20 ml 管中以供第二次提取;

建议将管倾斜约 45°。通过这样做,颗粒将移动,并且将有一些空间可用于沿着生物质颗粒移动巴斯德移液器而不接触它。在倾斜过程中,颗粒可能会破碎成较小的部分,但这不是问题。

j) 将沉淀留在 10 ml Pyrex®管中;

向该沉淀中添加 4 ml 氯仿/甲醇 (体积比 1/1) ;

k) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;

l) 450 g 离心10分钟;

m) 离心后,仅观察到一相。将该溶剂层转移到相同的 20 ml Pyrex® 中与以前一样,使用与以前相同的巴斯德移液器。

8.2.3 第二次提取

在相同的剩余生物质颗粒上重复步骤 8.2.2 a) 从第一次提取。(不要称量新的生物质)。然后继续执行以下步骤:

a) 加入4ml甲醇,然后加入2ml氯仿;

b) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;

c) 加入 2 ml 氯仿,然后加入 2 ml 水 (10 ml Pyrex®管现已完全充满) ;

d) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;

e) 450 g 离心管 10 分钟;

f) 离心后形成两个溶剂相:用巴斯德吸管将上层移至废物容器中;

g) 使用仍在管中的同一巴斯德移液器将下层转移到与之前相同的 20 ml Pyrex® 管中。完成这一步后,移液器就可以扔掉了;

h) 将沉淀留在 10 ml Pyrex®管中;

i) 向该沉淀中添加 4 ml 氯仿/甲醇 (体积比 1/1) ;

j) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合;

k) 在分析天平上称量圆底烧瓶 (预先在烘箱中于 103 °C 干燥,然后冷却至室温),精确至 0.01 mg (即空烧瓶重量) (或 0.1 mg,具体取决于分析天平的可读性) ;

l) 为圆底烧瓶配备漏斗和滤纸。1、加入5克硫酸钠
过滤纸;

烧瓶中不得加入硫酸钠粉末,这一点非常重要,否则总脂质含量将被高估。干燥后出现晶体表明硫酸钠已溢出到烧瓶中。如果发生这种情况,则应使用新样品重新开始该方法。建议格外小心。

- m) 将 20 ml Pyrex® 管中的溶剂通过带有硫酸钠层的滤纸过滤至除去剩余的水；
- n) 对重新提取后仅含有 1 层溶剂层的 10 ml Pyrex® 管中的溶剂和沉淀进行同样的处理。当通过滤纸过滤溶剂时，颗粒也可能最终留在滤纸中。这不是问题；
- o) 过滤后，当 10ml 和 20ml 管为空时，用氯仿/甲醇（体积 1/1）仔细冲洗管和滤纸。将管冲洗两次，每次使用一根巴斯德吸管的体积。滤纸漂洗 3 次，每次用巴斯德吸管的 6 倍体积（滤纸上可能残留一些绿色雾气）。氯仿/甲醇的用量不必严格准确，但要足够；
- p) 当所有溶剂都在烧瓶中时，可以在减压下用旋转蒸发器系统将其除去。
压力设置如下：
- 2 分钟内从 30 kPa 降至 27 kPa；
 - 5 分钟内 27 kPa 至 16 kPa；
 - 在 16 kPa 下保持 5 分钟；
 - 1 分钟内 16 kPa 至 4.3 kPa；
 - 在 4.3 kPa 压力下保持 4 分钟。

在此过程中，圆底烧瓶在 40°C（不更高）的温水浴中轻轻地（100r/min 至 200r/min）旋转。最后一点冷凝水应通过用氮气手动冲洗来除去。为此，请在氮源上使用带有巴斯德移液器的连接管，并用巴斯德移液器的尖端在烧瓶中移动。如果无法用氮气冲洗，则只需省略此步骤（或在旋转蒸发器上停留更长时间或在通风柜中放置过夜），并且不要通过在高于 40 °C 的温度下加热来代替。

- q) 让烧瓶在干燥器中冷却至室温 15 分钟，并再次称重，精确至 0.01 毫克（即提取后烧瓶的重量）（或 0.1 毫克，具体取决于分析天平的可读性）。

8.3 细胞破碎程序

8.3.1 概述

细胞破碎程序应通过以下步骤进行。除称重外，整个过程均应在通风柜下进行。

8.3.2 首次提取

- a) 在珠磨机的接收器中称取约 100 mg 测试样品的测试部分（即重量测试部分）；
- b) 记录重量，精确到 0.01 mg（或 0.1 mg，具体取决于分析仪器的可读性）平衡）；
- c) 加入 2ml 甲醇和一颗珠子；
- d) 以 30 Hz 的频率敲击珠子 15 分钟；

- e) 将溶剂转移至 10 ml Pyrex®管中；
- f) 将 2 ml 甲醇添加到珠打器的接收器中,摇动并将溶剂转移到 10 ml Pyrex®管；
- g) 将 2 ml 氯仿加入到珠打器的接收器中,摇匀并将溶剂转移到 10 ml Pyrex®管；
- h) 将 0.4 ml 软化水添加到 10 ml Pyrex®管中；
- i) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合；
- j) 添加 2 ml 氯仿,然后添加 2 ml 软化水 (10 ml Pyrex®管现在完全填充)；
- k) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合；
- l) 450 g离心10分钟；
- m) 离心后形成两个溶剂相 (通常被生物质颗粒分开) :除去用巴斯德吸管将上层移至废物容器；
- 注:该层是废物,含有糖、蛋白质和矿物质。
- n)使用巴斯德移液器将下层转移至 20 ml Pyrex®螺帽管中。每个测试部分使用另一支巴斯德移液器,并将该移液器保留在20 ml管中以进行第二次提取；
- 建议将管倾斜约 45°。通过这样做,颗粒将移动,并且将有一些空间可用于沿着生物质颗粒移动巴斯德移液器而不接触它。在倾斜过程中,颗粒可能会破碎成较小的部分,但这不是问题。
- o) 将沉淀留在 10 ml Pyrex®管中。向其中添加 4 ml 氯仿/甲醇 (体积 1/1) 颗粒；
- p) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合；
- q) 450 g 离心管 10 分钟；
- r) 离心后,仅观察到一相。将该溶剂层转移到相同的 20 ml Pyrex® 中与以前一样,使用与以前相同的巴斯德移液器。

8.3.3 第二次提取

对相同的剩余生物质颗粒重复 8.2.2 中的步骤 a) 和 b)。(不要称量新的生物质)。
然后继续执行以下步骤：

- a) 加入4ml甲醇,然后加入2ml氯仿；
- b) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合；
- c) 加入 2 ml 氯仿,然后加入 2 ml 水 (10 ml Pyrex®管现已完全充满)；
- d) 涡旋至少 30 s,直至不同层充分混合；
- e) 450 g 离心管 10 分钟；

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/158115121017006036>