

研究简报

用氯仿-甲醇抽提法测定鱼体脂肪含量的研究^{*}

王少梅 陈少莲 崔奕波

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

ON THE PROCEDURES OF CHLOROFORM-METHANOL EXTRACTION FOR THE DETERMINATION OF LIPID CONTENT OF FISH SAMPLES

Wang Shaomei Chen Shaolian and Cui Yibo

(*Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan 430072*)

关键词 脂肪测定, 方法

Key words Lipid analysis, Method

脂肪含量的测定, 是鱼类能量学及营养学的重要环节^[1]。目前最常用的测定方法, 是用氯仿-甲醇(2:1)混合液(下面简称 C-M 液)抽提^[1]。这一方法的基本步骤见图 1。不同研究者采用的具体步骤有所差异。如崔奕波^[1]引用的方法系将样品用 C-M 液匀浆后直接离心, 而 Hopkins 等^[2]对样品不匀浆, 仅用 C-M 液浸泡半小时后离心。这一方法最初是用于医学检验; 在生态学研究, 常需要测定大量样品, 故方法的简化尤为重要。本研究的目的是探讨不同抽提步骤对测定结果的影响, 以期对原方法进行简化; 同时将 C-M 抽提法与我国常用的索氏乙醚抽提法进行比较。

材料及方法

采用的材料为 70℃ 下干燥的泥鳅粉, 同一实验采用同一批样品。通过改变图 1 所列基本方法中的某些步骤, 来探讨测定步骤对结果的影响。

结 果

1. 预抽提步骤的影响 采用三种预抽提方法: (1) 用 C-M 液匀浆后浸泡 24h (基本方法); (2) 匀浆后立即离心 (省去图 1 中步骤 3); (3) 不匀浆, 浸泡 24h 后离心 (省去图 1 中步骤 2)。结果表明, 这三种预抽提方法得到的结果无显著差异 (表 1)。

2. 预抽提时间的影响 不匀浆, 用 C-M 液浸泡一段时间后离心 (即省去图 1 中步骤 2)。浸泡时间为 24h, 12h, 2h, 0.5h 及 0h。结果见表 2。浸泡时间为 2—24h 时, 测定结果无显著差异; 浸泡时间为 0 或 0.5h 时, 结果偏低。故浸泡时间应为 2h 以上。

3. 提纯步骤的影响 预抽提方法为用 C-M 液浸泡 12h, 提纯方法为: (1) 用 CaCl_2 溶液清洗两次 (图 1 中基本步骤); (2) 省去第二次清洗 (省去图 1 中步骤 8); (3) 不提纯 (省去图 1 中步骤 6—8)。结果表明, 三种提纯方法所得结果无显著差异 (表 3)。故提纯可以省去。

^{*} 本项研究在淡水生态与生物技术国家重点实验室完成。
1992 年 8 月 20 日收到。

步骤

step

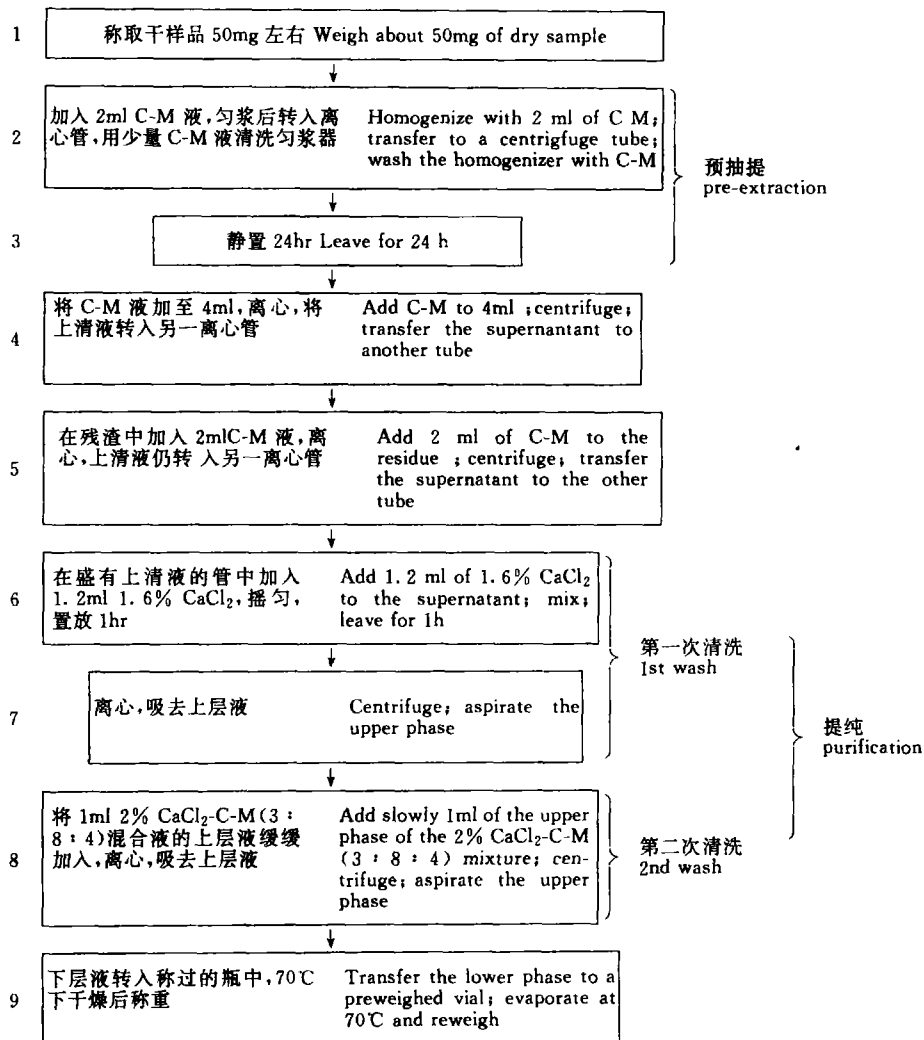


图 1 测定脂肪含量的基本方法。抽提剂为氯仿-甲醇(2:1)(C-M), 离心时间均为 10 分钟, 转速 3000r/min

Fig. 1 Basic method for the determination of lipid content. The solvent is chloroform-methanol(2:1)(C-M). Centrifugation is always at 3000 rpm and lasts for 10min

表 1 预抽提方法对脂肪测定结果的影响

Tab. 1 Effect of pre-extraction method on the result of lipid determination

预抽提方法 Pre-extraction	脂肪含量(%) Lipid content ($\bar{x} \pm S. E.$)	N	方差分析 Anova
匀浆+浸泡 24h Homogenization+soaking for 24h ¹	20.29 \pm 0.54	10	p=0.982
匀浆 Homogenization ²	20.23 \pm 0.77	10	
浸泡 24hr Soaking for 24h ³	20.12 \pm 0.50	10	

1. 图 1 所示基本方法;2. 省去图 1 中步骤 3。3. 省去图 1 中步骤 2

1. Basic method in Fig. 1. 2. Omission of step 3 in Fig. 1. 3. Omission of step 2 in Fig. 1.

表 2 预抽提时间对脂肪测定结果的影响¹

Tab. 2 Effect of pre-extraction time on the result of lipid determination

抽提时间 Extraction time (h)	脂肪含量(%) Lipid content ($\bar{x} \pm S. E.$) ²	N	方差分析 Anova
24	22.78 \pm 0.41a	10	p<0.001
12	22.38 \pm 0.28a	9	
2	22.38 \pm 0.42a	9	
0.5	20.86 \pm 0.57b	10	
0	20.58 \pm 0.29b	10	

1. 基本方法如图 1, 省去步骤 2。2. 字母表示多重比较结果(LSD 法), 具有相同字母的值无显著差异(0.05 水平)

1. The basic method is as shown in Fig. 1, with omission of step 2. 2. Letters indicate results of multiple range tests (LSD procedure); means with the same letter are not significantly different from each other at the 0.05 level

表 3 提纯步骤对脂肪测定结果的影响

Tab. 3 Effect of purification procedure on the result of lipid determination

提纯步骤 Purification procedure	脂肪含量(%) Lipid content ($\bar{x} \pm S. E.$)	N	方差分析 Anova
图 1 中基本方法 Basic method in Fig. 1 ¹	19.47 \pm 0.32	10	p=0.656
省去第二次清洗 Omission of 2nd wash ²	19.95 \pm 0.50	10	
两次清洗均省去 Omission of both washes ³	19.72 \pm 0.25	9	

1. 省去步骤 2。2. 图 1 中省去步骤 2, 8。3. 图 1 中省去步骤 2, 6-8

1. Omission of step 2. 2. Omission of steps 2 and 3 in Fig. 1. 3. Omission of steps 2 and 6-8 in Fig. 1

表 4 氯仿-甲醇冷抽提法与索氏乙醚抽提法的比较

Tab. 4 Comparison of chloroform-methanol cold extraction with Soxhlet extraction with ether

方法 Method	脂肪含量(%) Lipid content ($\bar{x} \pm S. E.$)	N	方差分析 Anova
氯仿-甲醇法 C-M method ¹	19.70 \pm 0.45	12	p<0.001
乙醚法 Ether method	13.80 \pm 0.20	12	

1. 图 1 中基本方法, 省去步骤 2; 预抽提时间为 12h

1. Basic method in Fig. 1, with omission of step 2; the pre-extraction time was 12h

4. 与索氏乙醚抽提法的比较 C-M 抽提步骤同图 1, 但预抽提仅用 C-M 液浸泡 12h。索氏乙醚抽提在脂肪自动抽提仪 (Soxtec System HT6, 瑞典 Tecator 公司) 中进行, 抽提温度为 100℃。

结果表明, 索氏乙醚抽提法得出的结果要显著低于 C-M 抽提法 (表 4)。

讨 论

C-M 抽提法中, 用 C-M 液匀浆是比较费时的步骤。本研究表明, 这一步骤可以省去, 但样品应在 C-M 液中浸泡 2h 以上。

在粗提取液中加入无机盐溶液提纯的目的是去除非脂类杂质。本研究表明, 这一步骤对研究结果无显著影响。这可能是由于粗提取液中杂质可以忽略, 也可能是由于加入盐溶液离心后, 对上层液难以完全吸除, 残留的盐分子增加了提取物的重量^[2]。若对测定精度要求不是很高, 提纯这一步骤可以省去。

Elliott^[3]提出, 乙醚对磷脂的提取率很低, 因而用乙醚抽提法测定鱼体脂肪含量是不可靠的。本研究结果证实了这一点。今后应避免采用这一方法。

参 考 文 献

- [1] 崔奕波. 鱼类生物能量学的理论与方法. 水生生物学报, 1989, 13(4): 369—383.
- [2] Hopkins C C E, Seiring J V, Nyholmen O. Ecological energetics from total lipid and total protein: fact and artifact using a gravimetric method for lipid and a biuret method for protein. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 1984, 22: 211—261.
- [3] Elliott J M. Body composition of brown trout (*Salmo trutta* L.) in relation to temperature and ration size. *J. Anim. Ecol.*, 1976, 45: 273—289.