

赵会芳, 张习金, 张永康, 等. 索氏抽提法测定花生脂肪含量的方法改进[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(10): 154–156, 163.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.10.043

索氏抽提法测定花生脂肪含量的方法改进

赵会芳¹, 张习金¹, 张永康², 崔志钢¹, 王 琨¹, 顾昌华¹

(1. 铜仁职业技术学院农学院, 贵州铜仁 554300; 2. 铜仁职业技术学院经济与管理学院, 贵州铜仁 554300)

摘要: 为准确快速地测定花生中的脂肪含量, 对花生脂肪测定进行探索与改进, 在原方法的基础上增加抽提前对样品进行石油醚浸泡, 设定 5、8、11 h 3 个浸泡时间与 2、4、8 h 3 个抽提时间, 与不浸泡、抽提 7 h 的对照进行对比。对试验结果进行精确性和准确性分析, 结果表明本试验精确度高。对各处理与对照进行 *t* 检验, 处理 1 和处理 4 与对照差异极显著, 处理 2 与对照差异显著, 余下处理与对照差异不显著且检验数据稳定。结果表明, 浸泡 11 h 抽提 2 h 时为最快的测定方法, 其次为浸泡 8 h 抽提 4 h, 与原方法抽提 7 h 相比, 节约了工作时间和试验试剂, 且其结果准确、可靠, 能替代原方法使用。

关键词: 花生; 石油醚提取物; 脂肪含量; 索氏抽提法; 改进方法; 缩短测定时间

中图分类号: S565.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)10-0154-03

花生为世界上四大油料作物之一, 脂肪和蛋白质含量丰富, 为食用蛋白质、植物油及食品原料的重要来源。目前, 我国常用的脂肪测定方法有索氏抽提法、巴布科克氏法^[1]、罗斯-哥特里法、酸水解法^[2]、盖勃氏法、氯仿-甲醇提取法、近红外光谱技术^[3]和气相色谱法^[4]等, 然而最常用的为经典的索氏抽提法, 具有稳定性好、准确度高特点, 但存在测定时间过长、测定值偏小、测定数量少等不足, 需不断改进。由于有机溶剂的抽提物中除脂肪外, 还含有游离脂肪酸、蜡、色素、甾醇及磷脂等类脂物质, 因而索氏提取法测定的结果只能是粗脂肪含量, 即用低沸点有机溶剂(石油醚)回流抽提, 把样品中的粗脂肪去除, 以样品与残渣质量之差或抽提瓶反应前后之差(干燥情况下)计算粗脂肪含量。就酸水解法而言, 与索氏抽提法比较的优势在于其操作简便、快速、准确, 不受特殊器材限制, 且适用于各种类型样品的测定^[5-6], 但操作危险性较大。索氏抽提法要更好地发展还有许多有待改进的地方。

索氏抽提法从问世至今, 经过不断的改进, 方法的实用性越来越好。张俭朴等在脂肪抽提器改进和试验中对脂肪抽提器中的纸筒进行扩大, 使样品更好地与抽提液接触, 对冷凝管进行加长改进, 提高冷凝效果, 也提升了抽提回流速度^[7]。冯慧等对滤纸筒的大小进行调整, 在样品中加入 1:1 的海沙, 并用蒸汽进行加热, 能较好地缩短抽提时间, 但海沙必须洁净以及蒸汽温度不易控制, 致使这个方法后面只采用对滤纸筒的改进^[8]。严映德等对样品测定前, 先将样品打磨粉碎, 粉碎后再烘干, 这样打磨时细胞里还有水分, 不会产生凝块以及渗出现象^[9]。该方法开始的抽提液为乙醚, 对人体伤害大且为易制毒化学品, 与空气混合会发生爆炸, 危险性极大。在脂肪测定教学中的影响因素及改进方法中, 罗有文等

对乙醚进行替换, 改用不易挥发、沸点低和安全性较高的石油醚^[10]。在魏红等的索氏抽提法测定粗脂肪含量的改进^[11]和王玉玲等的索氏抽提法测定粗脂肪含量方法的探讨^[12]等文章中, 对脂肪测定的计算方法进行探索, 得出抽提瓶抽提前后的质量差和抽提前后滤纸包质量差为样品脂肪含量, 这样可免去对抽提瓶的重复清洗工作, 且可与原方法替代使用。钟艳梅等在脂肪抽提时, 增加了抽提样品数量, 由原来的 1 个样品增加到 3 个, 大大提高了工作效率^[13]。在张江荣等的食品中粗脂肪测定方法的改进研究一文中, 对样品用抽提液浸泡过液, 抽提时间有所缩短, 但未作出具体时间的测定^[14]。目前, 随着索氏抽提法的不断完善, 相应的抽提仪器随之出现, 如 SZC-C 型和 ST-06C 型等, 为脂肪测定的研究提供了便利, 大大加快了对脂肪含量方面的研究进展。

前人索氏抽提法进行的改进均未涉及到花生脂肪的测定, 而花生产量为四大油料作物之首, 占有很大的市场前景。测定花生的脂肪含量能为花生加工、自身品质提供衡量的依据。本研究通过提前对样品进行浸泡处理, 随浸泡时间不同而不同程度缩短抽提时间, 达到缩短测定时间的目的, 保护实验者自身安全, 减少资源浪费和保护环境, 对花生和油料作物脂肪测定有很好的理论和实际意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黔花生 4 号, 源于贵州省农作物品种资源研究所。

1.2 主要仪器与试剂

ST-06C 型脂肪测定仪、干燥箱、干燥器、电子天平(感量 0.000 1 g)、实验用打磨机、石油醚(沸程 60~90 ℃)。

1.3 试验设计

本试验设置 2、4、6 h 3 个不同的抽提时间, 对抽提前花生用石油醚进行浸泡, 设置 5、8、11 h 3 个浸泡时间, 共 9 个处理, 以不浸泡抽提 7 h 为对照, 重复 3 次。试验设计见表 1。

1.4 试验方法

1.4.1 试样选取 对花生样品进行预选, 选取完整无坏死、

收稿日期: 2016-10-27

基金项目: 贵州省科学技术基金(编号: 黔科合 J 字[2013]2274 号)。

作者简介: 赵会芳(1976—), 女, 陕西宝鸡人, 博士, 副教授, 研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail: rest-ok@sohu.com。

表 1 不同处理的浸泡时间和抽提时间设置

处理	浸泡时间(h)	抽提时间(h)
处理 1	5	2
处理 2	8	2
处理 3	11	2
处理 4	5	4
处理 5	8	4
处理 6	11	4
处理 7	5	6
处理 8	8	6
处理 9	11	6
CK	0	7

无病斑、饱满的花生仁,再用四分法对花生样品进行筛选取样。

1.4.2 试验前处理 每个处理称取 10 g 装入铝盒放入干燥箱中在 105 ℃ 下干燥 7 h,在干燥器中冷却 30 min 后称质量,再烘干 30 min 后称质量,2 次质量之差小于 0.000 8 g 为恒质量^[15]。进行粉碎,称取 2~3 g 样品(准确至 0.000 2 g,记作 m),用滤纸(直径 12.5 cm)折叠包上(记作 m_1),再用铅笔编上序号。

1.4.3 测定步骤 将包好的滤纸包放入棕色瓶中,加入石油醚使溶液高出滤纸包 1~2 cm,按不同处理时间浸泡。浸泡完成后将滤纸包放入吊篮中,每个吊篮放 2 个^[16],在抽提瓶中加入 50 mL 石油醚。连接好抽提器各部分,打开冷凝水水流,调节水温在 80 ℃,打开石油醚回流开关,待水温升至 80 ℃ 开始计时,抽提时间按设计要求控制。抽提完毕后,用镊子取出滤纸包,在通风处使石油醚挥发 10~15 min,放入 105 ℃ 干燥箱中干燥 2 h,冷却至恒质量(记作 m_2),对抽提瓶中石油醚进行继续加热,再冷凝回收。

1.4.4 结果计算

$$\text{粗脂肪含量} = (m_1 - m_2) / m \times 100\%。$$

2 结果与分析

2.1 抽提时间对测定脂肪含量的影响

由表 2 中平均值和图 1 可知,随着抽提时间的延长,测定脂肪含量增加,抽提 2~4 h 时测定的脂肪含量增速最快。抽提时间为 2 h 时脂肪含量平均值最小,为 51.38%;抽提 6 h 时平均值最大,为 54.87%。抽提 2~6 h,脂肪含量与抽提时间呈正相关,抽提 6 h 后脂肪含量保持稳定。

表 2 不同处理下测定的脂肪含量

抽提时间 (h)	不同浸泡时间下脂肪含量(%)				平均值
	0 h	5 h	8 h	11 h	
2		46.99	52.12	55.04	51.38
4		49.12	54.97	55.01	53.03
6		54.68	54.98	54.96	54.87
7	55.03				
最大相对偏差		7.69	2.86	0.08	

2.2 浸泡时间与测定脂肪含量的关系

随浸泡时间的延长,脂肪含量增加,浸泡 5~8 h 的脂肪含量增加最快。在浸泡 5 h 时最大相对偏差最高,达到 7.69%;浸泡 8 h 次之,为 2.86%;浸泡 11 h 为 0.08%,测定

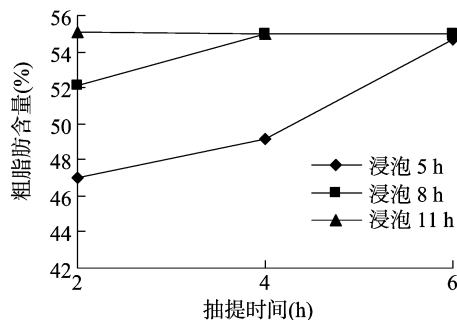


图1 不同抽提时间对测定脂肪含量的影响

值最稳定(表 2)。从图 2 中可知,随浸泡时间延长,3 个抽提时间下的脂肪含量接近相等,且趋近于对照,在浸泡 11 h 后脂肪含量基本不变,近似相等等于对照,此时脂肪含量最大,为 55.04%。

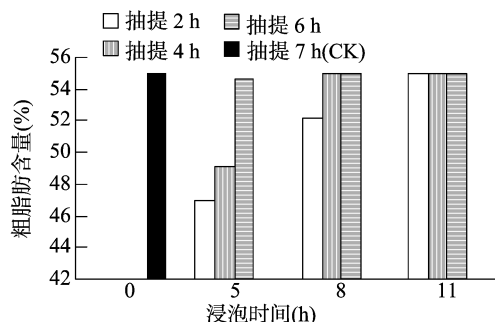


图2 不同浸泡时间对测定脂肪含量的影响

2.3 改进法的精密度

对改进法的精密度进行试验比较分析(表 3),改进法各处理的标准差最大为 0.90%,最小为 0.42%,且变异系数最大为 1.91%,最小为 0.60%,表明试验结果的离散程度不大。试验结果表明,改进法的重现性好,方法的精密度高。

表 3 改进法的精密度试验

处理	脂肪含量(%)					变异系数 (%)
	重复 1	重复 2	重复 3	平均值	标准差	
处理 1	46.27	46.70	48.00	46.99	0.90	1.91
处理 2	52.96	51.45	51.49	51.97	0.86	1.65
处理 3	55.17	55.37	54.57	55.04	0.42	0.75
处理 4	48.46	49.68	49.22	49.12	0.62	1.25
处理 5	55.16	55.63	54.11	54.97	0.78	1.42
处理 6	55.04	54.77	55.26	55.02	0.37	0.68
处理 7	54.73	54.00	55.30	54.68	0.65	1.19
处理 8	55.18	54.21	55.56	54.98	0.69	1.27
处理 9	54.88	55.71	54.30	54.96	0.71	1.29
CK	55.02	54.61	55.47	55.03	0.43	0.60

2.4 改进法的准确性

通过对不同处理进行脂肪测定,将不同处理与原方法(CK)配对进行 t 检验,结果如表 4 所示,其中 $t(2, 0.05) = 4.303$, $t(2, 0.01) = 9.925$,处理 1 和处理 4 与原方法(CK)差异极显著,处理 2 与原方法差异显著,处理 3、处理 5、处理 6、处理 7、处理 8、处理 9 与原方法差异不显著,其中处理 3 与原方法差异最小,处理 6 次之。差异不显著的几个处理整体稳定性较好,数据波动不大。

表 4 改进法与原方法准确性试验

重复号	脂肪含量测定值(%)									
	处理 1	处理 2	处理 3	处理 4	处理 5	处理 6	处理 7	处理 8	处理 9	CK
1	46.27	52.96	55.17	48.46	55.16	55.04	54.73	55.18	54.88	55.02
2	46.70	51.45	55.37	49.68	55.63	54.77	54.00	54.21	55.71	54.61
3	48.00	51.49	54.57	49.22	54.11	55.26	55.30	55.56	54.30	55.47
t 检验值	13.952 **	5.515 *	-0.019	13.623 **	0.123	0.023	0.784	0.099	0.139	

注：“*”为差异显著，“**”为差异极显著； $t(2,0.05)=4.303$ ， $t(2,0.01)=9.925$ 。

3 结论

3.1 方法改进的效果

本试验花生含水量为 12.84%，为自然风干花生，对试验结果基本无影响，且在李正强等高产高油花生新品种黔花生 4 号的选育中测出的黔花生 4 号脂肪含量范围^[17]内。抽提 6 h 时抽提瓶中冷凝回收的石油醚颜色正常，则粗脂肪已完全提取^[18]，说明在测定的脂肪含量不变的情况下，浸泡时间的延长能缩短抽提时间。在原方法的基础上增加浸泡的步骤，能大大缩短抽提时间。本试验中当浸泡 11 h、抽提时间 2 h 时为最快，其次为浸泡 8 h、抽提 4 h，分别缩短了 5 h 和 3 h 的抽提时间。而在浸泡过程中无需管理，通过对试验时间的合理安排，能明显提高工作效率，在抽提过程中石油醚会发生挥发，本方法减少了石油醚的挥发量，提高了回收率，减少了能源的消耗。通过试验验证，改进法的精确度较高，与原方法的测定结果差异不显著，可靠性高。

3.2 方法改进的优点及操作注意事项

改进法的优点可归纳为节省时间、减少检测工作量、节约试剂、减少试剂损失和环境污染几点，原方法未进行试样浸泡，抽提时间比用石油醚浸泡 11 h 的多用 5 h，改进法采用每个抽提瓶 2 个滤纸包，在原来测定量的基础上翻了 1 倍，且在测定样品粗脂肪前，对样品进行烘干处理，样品中不含水分，可以加快石油醚进入样品内部的速度，使脂肪全部抽提出来的抽提时间缩短明显；改进法在抽提结束后对滤纸包进行干燥处理，避免干燥除去溶剂时的脂肪氧化问题，提高结果测定的精密度以及工作效率；随着温度升高，回流冷凝的效果变差，抽提时间越长石油醚浪费越多，而石油醚对人体眼睛、黏膜和呼吸道有刺激性，对皮肤有强烈刺激性，对环境造成污染。缩短抽提时间既减少试剂浪费，也减少环境污染以及对人体的伤害，提高了本试验的安全性；石油醚的挥发量明显降低，且对冷凝回流的流动水使用量减少 2/3 还要多，测定样品时，在 7 h 的情况下，原方法只能测定 1 次，而改进方法能测定 3 次以上，大大缩短了测定时间，提高工作效率。

在试验过程中应该注意，整个测定过程中应戴上手套和口罩，避免手上油脂影响试验结果和石油醚的挥发对人体呼吸道的刺激；称样量不宜过多，且滤纸应选中号（11 cm），滤纸包应包严实，避免浸泡时间过长而散开，且保证滤纸包能放入抽提管中的吊篮内且不滑落；抽提结束后取滤纸包时，不能弄破滤纸，以保证试验的准确性；在环境条件要求上，样品与滤纸应在 105℃下烘干 7 h，当室内湿度过大时（大于 60%），为提高试验准确度，对天平添加干燥试剂，其他称量工具进行干燥处理，且称量过程应严格规范；在脂肪测定过程中，对不同处理间的脂肪含量会有所影响，测定时应将不同处理分开

测定；为保证石油醚在样品中的渗透速度一致和快速，对样品打磨时应充分均匀，必要时应将样品过筛。

3.3 讨论

在张江荣等的食品中粗脂肪测定方法的改进研究^[14]一文中，对大豆进行浸泡过夜再抽提的试验结果表明，浸泡过夜后能缩短抽提时间 4 h，缩短时间也比较明显，与本试验结果较为一致。但从其文章中可知，大豆的脂肪含量低于花生，改进后的抽提时间却为 6 h，明显高于本研究的抽提时间。这可能是因为在本研究中花生抽提时间为 6 h 时，浸泡时间为 5 h，而其文内只是提到浸泡过夜，浸泡时间不具体；温度和对样品的处理方式也是影响渗入样品速度的主要因素，浸泡效果与其有直接关系，而其浸泡时温度不明确，本研究则控制到室温。本研究对样品先打磨成粉状再干燥，能增加浸泡的效果；花生自身的结构和内部物质与大豆有所区别，就如花生含有花生四烯酸，大豆含有亚油酸、亚麻酸，这几类物质都在抽提测定的粗脂肪中，而相互不含有，这几类物质可能也是影响抽提速度的原因之一。在抽提前对样品先进行浸泡的相关研究中，均达到了缩短测定时间、提升工作效率的效果，可以看出浸泡也是对样品的一个缓慢抽提，对脂肪抽提有重要作用。

油料作物有花生、大豆、油菜、芝麻和棉籽等，种类繁多，为植物油的市场主导。为加快对各种油料作物脂肪含量的研究，提高工作效率是重要因素，而本研究因时间、设备和种质资源等有限，只对花生进行了初步研究。而其他油料作物可采取本研究的试验方法，但上文中花生与大豆就有一定的差别，在本研究的基础上，还需进行更进一步的研究，以此来发展我国的油料作物在经济市场的地位。

参考文献：

[1] 黄晓东,高新义,李绍中,等. 巴氏法测定牛乳脂肪的改进[J]. 检测与分析,2006,12(9):46-47.
[2] 于文萃. 五类常见食品脂肪含量的测定[J]. 黑龙江生态工程职业学院学报,2013,26(6):27-28.
[3] 刘永惠,沈一,陈志德. 利用近红外技术与评价花生资源的品质性状[J]. 花生学报,2013,42(2):21-27.
[4] 梁岐. 气相色谱法快速测定油脂中脂肪酸的方法研究[J]. 吉林农业科学,1986(1):82-84.
[5] 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京:中国标准出版社,1985:22-23.
[6] 中华人民共和国卫生部. 食品卫生检验方法理化部分[S]. 北京:技术标准出版社,1979:10.
[7] 张俭朴,刘丹. 脂肪抽提器的改进和试验[J]. 油脂工业,1976(1):44-52.
[8] 冯慧,洪家敏. 索氏抽提法测定大豆粉中脂肪含量方法改进研

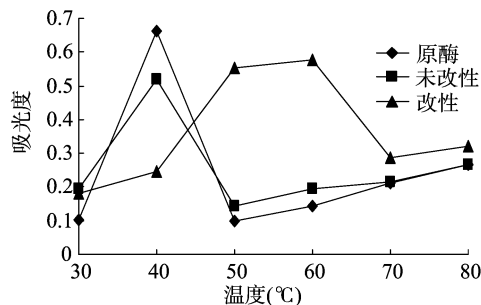


图6 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶最适温度

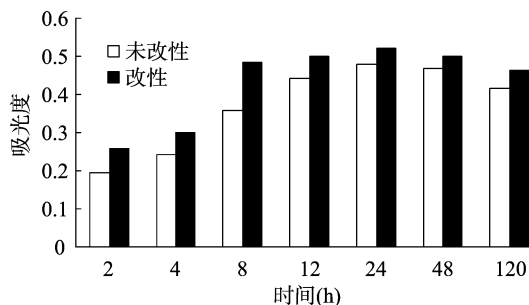


图7 改性前后壳聚糖作为载体的固定化酶稳定性比较

改性固定化酶最适温度为 40 ℃,通过试验对比改性固定化酶与未改性固定化酶发现,改性固定化酶热稳定性与贮藏稳定性更高。

壳聚糖与甲壳素作为自然界唯一的碱性多糖,来源广泛,更简单制备,对于其利用开发,对环境保护和资源开发有着一定的作用^[9-13]。通过研究发现,将壳聚糖通过化学方法改性处理后,壳聚糖的分子结构产生了变化,性质也跟改性前大不相同,在戊二醛浓度对固定化酶活性影响的试验中,改性壳聚糖固定化酶的最适 pH 值高于未改性壳聚糖,固定化酶的活性也比未改性壳聚糖固定化酶的略高,在对温度的研究中,改性固定化酶比未改性固定化酶的耐受温度更高,稳定性也更强。酶的活性容易受环境条件的影响,通过固定化,正好可以将纤维素酶的活性得以保留。

参考文献:

- [1] 武娜娜. 壳聚糖改性吸附剂的制备及其在重金属污染的污水和土壤处理中的应用[D]. 广州:华南理工大学,2014.
- [2] 农 向,胥成浩,伍 红. 交联改性前后壳聚糖的纤维素酶固定效率研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(2):424-425.
- [3] Jones P O, Vasudevan P T. Cellulose hydrolysis by immobilized *Trichoderma reesei* cellulase[J]. Biotechnology Letters,2010,32(1):103-106.
- [4] Sohel D, Aparna S, Nath G M. A multipurpose immobilized biocatalyst with pectinase, xylanase and cellulase activities[J]. Chemistry Central Journal,2007,1(1):1-5.
- [5] 农 向. 瑞氏木霉 QM9414 产纤维素酶的研究[D]. 成都:西南民族大学,2006.
- [6] Panagiotou G, Olsson L. Effect of compounds released during pretreatment of wheat straw on microbial growth and enzymatic hydrolysis rates[J]. Biotechnology & Bioengineering,2007,96(2):250-258.
- [7] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. Bioresource Technology,2005,96(6):673-686.
- [8] 张 强. 用壳聚糖固定化纤维素酶的研究[D]. 西安:陕西科技大学,2005.
- [9] 高培基. 纤维素酶降解机制及纤维素酶分子结构与功能研究进展[J]. 自然科学进展,2003,13(1):21-29.
- [10] 杨永彬,黄谚谚,林跃鑫. 纤维素酶的结构及分子多样性[J]. 生命的化学,2004,24(3):21.
- [11] Saville B A, Khavkine M, Seetharam G, et al. Characterization and performance of immobilized amylase and cellulase[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2004,116(1):251-259.
- [12] Zhang J, Yan H, Yang T, et al. Removal of dicofol from water by immobilized cellulase and its reaction kinetics[J]. Journal of Environmental Management,2011,92(1):53-58.
- [13] Zhang Y H, Ding S Y, Mielenz J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions[J]. Biotechnology & Bioengineering,2007,97(2):214-223.
- [14] 张江荣,杨 军,董文明. 食品中粗脂肪测定方法的改进研究[J]. 现代农业科技,2013(3):333-334.
- [15] 聂国兴,王俊丽,肖 竞. 两种粗脂肪测定方法的比较研究[J]. 河南畜牧兽医,2001,22(7):7-8.
- [16] 方 敏,丁小霞,李培武,等. 索氏抽提测定含油量的方法改良及其应用[J]. 中国油料学报,2012,34(2):210-214.
- [17] 李正强,郭贵敏,杨顺国,等. 高产高油花生新品种黔花生4号的选育[J]. 湖北农业科学,2008,47(1):31-32.
- [18] 任志秋,孙淑华,乐也国. 测定大豆粗脂肪含量方法 SZC-C 型脂肪测定仪[J]. 黑龙江粮食,2003(5):36-37.

(上接第 156 页)

- [9] 严映德,周荣亮. 油菜籽含油量(索氏)测定试样处理方法的改进[J]. 粮油仓储科技通讯,1992(5):39-40.
- [10] 罗有文,刘俊栋,周红蕾,等. 脂肪测定教学中的影响因素及改进方法[J]. 现代农业科技,2014(23):340,343.
- [11] 魏 红,钟红舰,江 红. 索氏抽提法测定粗脂肪含量的改进[J]. 中国油脂,2004,29(6):52-54.
- [12] 王玉玲,丁淑芬. 索氏抽提法测定粗脂肪含量方法的探讨[J]. 粮食加工,2014,39(5):76-77.
- [13] 钟艳梅,曾宪录. 食品脂肪测定方法的改进[J]. 广东化工,2008,35(6):130-131.